

(19)



(11)

EP 1 282 700 B1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
27.02.2008 Patentblatt 2008/09

(51) Int Cl.:
C12N 15/11 (2006.01) **C12N 15/54** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) **C12N 9/12** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **C07K 16/40** (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01) **A01K 67/027** (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) **A61K 38/43** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Anmeldenummer: **01936370.4**

(22) Anmeldetag: **17.05.2001**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/EP2001/005660

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 2001/088108 (22.11.2001 Gazette 2001/47)

(54) **NEURONALE SERIN-THREONIN-PROTEIN-KINASE**

NEURONAL SERINE-THREONINE PROTEIN KINASE

SERINE-THREONINE PROTEINE KINASE NEURONALE

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR

- **KAMMANDEL, Birgitta**
69115 Heidelberg (DE)
- **JOMANA NAIM, Stephanie**
69123 Heidelberg (DE)
- **SCHWANINGER, Markus**
69120 Heidelberg (DE)

(30) Priorität: **17.05.2000 DE 10024171**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
12.02.2003 Patentblatt 2003/07

(74) Vertreter: **Isenbruck, Günter**
Isenbruck, Bösl, Hörschler, Wichmann, Huhn
Patentanwälte
Theodor-Heuss-Anlage 12
68165 Mannheim (DE)

(73) Patentinhaber: **AXARON Bioscience AG**
69120 Heidelberg (DE)

- (72) Erfinder:
- **SCHNEIDER, Armin**
69118 Heidelberg (DE)
 - **KLAUSSNER, Bettina**
69123 Heidelberg (DE)
 - **FISCHER, Achim**
69120 Heidelberg (DE)
 - **NEWRZELLA, Dieter**
69221 Dossenheim (DE)
 - **GÖTZ, Bernhard**
69121 Heidelberg (DE)
 - **ROSSNER, Moritz**
68723 Schwetzingen (DE)
 - **EISENHARDT, Gisela**
69126 Heidelberg (DE)
 - **KUNER, Rohini**
69126 Heidelberg (DE)
 - **TRUTZEL, Annette**
67227 Frankenthal (DE)

- (56) Entgegenhaltungen:
- EP-A- 1 130 094** **WO-A-97/23625**
WO-A-98/01756 **WO-A-99/42592**
WO-A-02/064791
- **DATABASE EMBL [Online] Hinxton, GB;**
Accession: AF240782, 20. April 2000 (2000-04-20)
DARMON, Y ET AL: "Mus musculus ELKL motif
Kinase 2 long form (EMK2) mRNA, complete cds."
XP002175126

EP 1 282 700 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

- DATABASE EMBL [Online] Hinxton, GB; Accession No: U64205, 28. April 1998 (1998-04-28) PENG, C.Y ET AL: "Homo sapiens Cdc25C associated protein kinase C-TAK1 mRNA, complete cds." XP002175127 -& PENG CHENG-YUAN ET AL: "C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding." CELL GROWTH & DIFFERENTIATION, Bd. 9, Nr. 3, März 1998 (1998-03), Seiten 107-208, XP001015918
 - DATABASE EMBL [Online] Hinxton; Accession No: AC005781, 8. Oktober 1998 (1998-10-08) LAMERDIN, J.E. ET AL: "Homo sapiens chromosome 19, cosmid R33632, complete sequence." XP002175128
 - DATABASE EMBL [Online] Hinxton, GB; Accession No: AB058763, 10. Mai 2001 (2001-05-10) OHARA, O ET AL: "Homo sapiens mRNA for KIAA1860 protein, partial cds" XP002175129
 - DATABASE EMBL [Online] Hinxton, GB; Accession No: AK027619, 15. Mai 2001 (2001-05-15) ISOGAI, T ET AL: "Homo sapiens cDNA FLJ14713 fis, clone NT2RP3000845, moderately similar to putative Serine-Threonine-Protein Kinase P78 (EC 2.7.1.-)" XP002175130
- DATABASE EMBL [Online] Hinxton, GB; Accession No: AB049127, 19. März 2001 (2001-03-19) NAKAMURA, Y. ET AL: "Homo sapiens MARKL1 mRNA for MAP/microtubule affinity regulating kinase like 1, complete cds" XP002175131 & KATO TATSUSHI ET AL: "Isolation of a novel human gene, MARKL1, homologous to MARK3 and its involvement in hepatocellular carcinogenesis." NEOPLASIA (NEW YORK), Bd. 3, Nr. 1, Januar 2001 (2001-01), Seiten 4-9, XP002175125
 - DREWES G ET AL: "MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 89, 18. April 1997 (1997-04-18), Seiten 297-308, XP002105681 ISSN: 0092-8674

Bemerkungen:

Die Akte enthält technische Angaben, die nach dem Eingang der Anmeldung eingereicht wurden und die nicht in dieser Patentschrift enthalten sind.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Serin-Threonin-Protein-Kinase, Nukleinsäuren, die diese Kinase kodieren und deren Verwendung zur Diagnose und Therapie neuronaler und neoplastischer Erkrankungen.

[0002] Apoplexie, auch Schlaganfall, Gehirnschlag, apoplektischer Insult genannt, ist bei ca. 15% aller Todesfälle beteiligt, wobei Männer und Frauen gleichermaßen betroffen sind. Die Symptome umfassen Bewußtseinsstörungen bis zum Koma, häufig auch spastische Hemiplegie, verschiedenste zentrale motorische, sensible und sensorische Ausfallerscheinungen sowie fokale oder generalisierte Krampfanfälle. In jedem Fall einer Apoplexie handelt es sich um eine mit Sauerstoffmangel einhergehende Kreislaufstörung im Bereich einer umschriebenen Hirnregion. Als Auslöser kommen zwei grundsätzliche Mechanismen in Betracht. Erstens, eine Massenblutung, Enzephalorrhagie, die in 15% der Fälle beteiligt ist, wobei diese nach Gefäßruptur meist der strio-lentikulären Arterien auftritt, wodurch begrenzte Hirnregionen zerstört werden. Dieser Mechanismus hat eine hohe Letalität zur Folge. Als Grundleiden kommen insbesondere Hypertonie, Arteriosklerose, Intrakranielles Aneurysma und in selteneren Fällen eine Verbrauchskoagulopathie in Frage. Als zweiter Mechanismus ist ein Hirninfarkt, Enzephalomalazie, beteiligt, wobei dies in 85% der Fälle als Ursache angesehen wird. Dabei kommt es in der Regel zur Ausbildung einer Nekrose. Ursache hierfür sind u.a. eine arterielle Thrombose, Thromboembolie oder funktionelle Ischämie bei offenem Gefäßlumen, z.B. in Folge eines Blutdruckabfalls. Der Hirninfarkt "ischämische Nekrose" ist zu etwa 70 - 80% die Ursache der Apoplexie. Häufig stellt Arteriosklerose das zugrundeliegende ursächliche Leiden dar. Die seltene, sich langsam entwickelnde Symptomatik einer Enzephalomalazie wird als "progressive stroke" bezeichnet. Als Vorboten eines Hirninfarkts sind passager auftretende neurologische Ausfallssymptome ohne Ausbildung von Gewebsschäden zu bewerten ("transitorische ischämische Attacken"). Als Ursache wird eine vorübergehende stenotisch bedingte oder durch Mikroembolien verursachte Durchblutungsstörung angenommen. Die Diagnose umfasst neben einer allgemeinen und neurologischen Untersuchung auch kraniale Computer-Tomographie, zerebrovaskuläre Doppler-Ultraschalluntersuchung, Lumbalpunktion, dynamische Hirnszintigraphie, EEG sowie Kernspinnresonanz-Tomographie.

[0003] Die molekularen Grundlagen der Ischämie und der damit verbundenen Folgeerscheinungen sind bis zum heutigen Tage nahezu unbekannt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass eine komplexe Folge an biochemischen Vorgängen bis zum Auftreten der Apoplexie erforderlich ist.

[0004] Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, Gene zu identifizieren, die an der Entstehung der Apoplexie in Folge lokalen Sauerstoffmangels beteiligt sind, und somit neue Prophylaxe- und Therapiemöglichkeiten der Apoplexie zu eröffnen. Ferner lag der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, Proteine zu identifizieren, die an der Entstehung der Apoplexie beteiligt sind.

[0005] Die genannten technischen Probleme werden gelöst durch eine Nukleinsäure, die für eine Serin-Threonin-Protein-Kinase kodiert, wobei die Nukleinsäure ausgewählt wird aus:

- a) Nukleinsäure, mit einer der Sequenzen nach SEQ ID Nr. 1 - 4 und Nukleinsäure, die für ein Protein mit einer Sequenz gemäß einer der SEQ ID Nr. 5 - 8 kodiert;
- b) Nukleinsäure, die für ein Protein kodiert, das mindestens 70% Identität zu einem Protein gemäß einer der SEQ ID Nr. 5 - 8 aufweist, und dessen Expression durch fokale cerebrale Ischämie und Reperfusion induziert werden kann.

[0006] Weiterhin werden folgende Nukleinsäuren beschrieben:

- i) Nukleinsäure, die mit einer Nukleinsäure nach a) hybridisiert;
- ii) Nukleinsäure, die unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes mit einer Nukleinsäure nach a) hybridisieren würde;
- iii) durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltener Derivate einer Nukleinsäure nach a) - c); und komplementäre Nukleinsäure zu einer Nukleinsäure nach a) - d).

[0007] Beispielsweise werden in Derivaten der Proteine gemäß SEQ ID Nr. 5 - 8 Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste und Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht. Dabei sind die physikochemischen Eigenschaften der ausgetauschten und austauschenden Aminosäure sehr ähnlich (z.B. die Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität). Es können aber auch eine oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden. Die solchermaßen gegenüber der SEQ ID Nr. 5-8 veränderten Proteine besitzen, bevorzugt wenigstens 70% und besonders bevorzugt wenigstens 90% Sequenzidentität zu den Sequenzen SEQ ID Nr. 5-8, berechnet nach dem Algorithmus von Altschul et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990. Das isolierte Protein und seine funktionellen Varianten lassen sich vorteilhafterweise aus dem Gehirn von Mammalia wie Homo sapiens, Rattus norvegicus oder Mus musculus isolieren. Auch Homologe aus anderen Mammalia sind unter funktionellen Varianten zu verstehen.

[0008] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gemäß SEQ ID Nr. 1 - 4 stellen Nukleinsäuren dar, wie sie aus Maus

(SEQ ID Nr. 1 und 2) bzw. Mensch (SEQ ID Nr. 3 und 4) isoliert werden. Dabei sind die Nucleinsäuren gemäß SEQ ID Nr. 2 und SEQ ID Nr. 4 längere Spleissvarianten der SEQ ID Nr. 1 bzw. SEQ ID Nr. 3. Als erfindungsgemäß werden auch solche Nucleinsäuren angesehen, die für ein Protein kodieren, das vorzugsweise mindestens 70%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90% Identität zu einem der Proteine wie durch SEQ ID Nr. 1 - 4 kodiert aufweist.

[0009] Erfindungsgemäße "Derivate" der oben genannten Nucleinsäuren, z.B. Allelvarianten, unterscheiden sich von den genannten Nucleinsäuren gemäß SEQ ID Nr. 1 - 4 durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen, wobei jedoch die Kinase-Aktivität beibehalten wird. Derivate, wie Homologe oder sequenzverwandte Nucleinsäuresequenzen können aus allen Säugerspezies, einschließlich Mensch, nach gängigen Verfahren durch Hybridisierung mit einer der erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen oder Fragmenten davon isoliert werden.

[0010] Unter "funktionellen Äquivalenten" sind auch Homologe der Nucleinsäure gemäß SEQ ID Nr. 1 - 4, beispielsweise Homologe aus anderen Mammalia, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang - DNA oder RNA oder PNA der codierenden und nicht codierenden Nucleinsäuresequenz zu verstehen. Solche funktionellen Äquivalente lassen sich ausgehend von den Nucleinsäuren der SEQ ID Nr. 1 - 4, beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik, aus anderen Vertebraten, wie Mammalia, isolieren. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft Oligonukleotide konservierter Bereiche, die vom Fachmann in bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren oder die vollständige Sequenz für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nucleinsäure - Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz - oder je nachdem, welche Nucleinsäureart - DNA oder RNA - für die Hybridisierung verwendet werden, variieren die Standardbedingungen zur Hybridisierung. So liegen beispielsweise Schmelztemperaturen für DNA: DNA-Hybride ca. 10° niedriger als die von DNA-RNA-Hybriden gleicher Länge.

[0011] Unter "Standardbedingungen" sind beispielsweise je nach Nucleinsäuretemperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wässrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid wie beispielsweise 42 °C in 5 x SSC, 50% Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20 °C bis 45 °C, bevorzugt zwischen etwa 30 °C bis 45 °C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30 °C bis 55 °C, bevorzugt zwischen etwa 45 °C bis 55 °C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nucleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nucleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nucleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

[0012] Unter dem Begriff "Derivate" der erfindungsgemäßen Sequenzen nach SEQ ID Nr. 1 - 4 sind auch Promotor-Varianten zu verstehen, die den kodierenden Bereichen der erfindungsgemäßen Sequenzen vorgeschaltet sind; diese können durch ein oder mehrere Nucleotidaustausche durch Insertion, Addition und/oder Deletion verändert sein, ohne dass die Promotor-Eigenschaften, insbesondere die Promotorstärke und Induzierbarkeit beeinträchtigt wird. Der Begriff Derivat umfasst jedoch auch solche Promotor-Varianten, die ausgehend von den erfindungsgemäßen Sequenzen durch Nucleotidaustausch(e) in ihrer Aktivität verstärkt werden.

[0013] "Neoplastische Erkrankungen" sind solche, die mit abnormen Wachstumsverhalten von Zellen, Wegfall interzellulärer Hemmmechanismen etc. zu tun haben. Dazu zählen z.B. Carcinome als abnorme Proliferationen endodermaler Zellen, lymphoneoplastische Erkrankungen, Melanome etc.

[0014] Eine bevorzugte Nucleinsäure kodiert für ein Protein mit einer Sequenz gemäß einer SEQ ID Nr. 5 - 8 oder ein Protein, das mindestens 70% Identität zu einer der genannten Sequenzen aufweist.

[0015] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Nucleinsäure zu mindestens 70% identisch zu den kodierenden Abschnitten einer der Sequenzen nach einer der SEQ ID Nr. 1 - 4.

[0016] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kodiert die Nucleinsäure eine Proteinsequenz nach einem der SEQ ID Nr. 5 - 8, wobei eine Nucleinsäure, die für die SEQ ID Nr. 7 kodiert besonders bevorzugt.

[0017] Vorzugsweise ist die erfindungsgemäße Nucleinsäure eine DNA, es kommen jedoch auch RNA oder PNA in Betracht.

[0018] Als erfindungsgemäße Nucleinsäure sind insbesondere solche bevorzugt, die geeignet sind, in Antisinnorientierung zu einem Promotor nach Einbringen in eine Wirtszelle die Expression einer Serin-Threonin-Kinase zu hemmen.

[0019] Erfindungsgemäße Konstrukte enthalten die erfindungsgemäße Nucleinsäuresequenz in Kombination mit weiteren Sequenzen, mit denen sie üblicherweise im Genom einer Wirtszelle nicht assoziiert sind. Solche "Fremdsequenzen" sind vorzugsweise genetische Regulationselemente, die Transkriptions- und Translationssignale (auch als "Expression

regulierende Elemente" bezeichnet oder von Vektoren abgeleitete Sequenzen). Mit diesen Elementen sind die erfindungsgemäßen Sequenzen funktionell verknüpft.

[0020] Diese Verknüpfung kann je nach gewünschter Anwendung zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Genexpression führen. Mit den solchermaßen hergestellten rekombinanten Nukleinsäurekonstrukten können Wirtsorganismen transformiert werden. Zusätzlich zu diesen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenzen inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Stattdessen kann die natürliche Regulationssequenz so mutiert werden, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Auch am 3'-Ende der erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte regulatorische Elemente inseriert werden. Die Nukleinsäuresequenzen nach SEQ ID Nr. 1 - 4 und/oder für die entsprechenden Proteine kodierende Sequenzen nach SEQ ID Nr. 5 - 8 können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein, oder auf getrennten Genkonstrukten lokalisiert sein. Vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in Promotoren wie *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacIq-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*, *I-PR-* oder im *I-PL-Promotor* enthalten, die vorzugsweise in gramnegativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren wie *amy* und *SPO2*, in den Hefepromotoren wie *ADC1*, *MFA*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH* oder in Mammaliapromotoren wie *CaM-Kinase 11*, *CMV*, *Nestin*, *L7*, *BDNF*, *NF*, *MBP*, *NSE*, *beta-Globin*, *GFAP*, *GAP43*, *Tyrosin Hydroxylase*, *Kainat-Rezeptor-Untereinheit 1*, *Glutamat-Rezeptor-Untereinheit B* enthalten. Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird. Unter "Enhancer" sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte Expression bewirken. Als weitere Regulationssequenzen seien beispielhaft die "locus control regions", "silencer" oder jeweilige Teilsequenzen davon genannt. Diese Sequenzen können vorteilhaft für eine gewebespezifische Expression verwendet werden. Eine bevorzugte Ausführungsform ist die Verknüpfung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit einem Promotor, wobei der Promotor 5' "upstream" zu liegen kommt. Weitere Regulationssignale wie 3'gelegene Terminatoren oder Polyadenylierungssignale oder Enhancer können funktionell in dem Nukleinsäurekonstrukt Anwendung finden. Unter dem Begriff sind auch komplette Vektorkonstrukte zu verstehen. Diese Vektorkonstrukte oder Vektoren werden zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus verwendet. Vorteilhafterweise werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder die Gene für die Ser-Thr-Proteinkinase in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im ausgesuchten Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch *Cloning Vectors* (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren wie *SV40*, *CMV*, *Baculovirus*, *A-denovirus*, *Sindbisvirus*, *Transposons*, *IS-Elemente*, *Phasmide*, *Phagemide*, *Cosmide*, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden. Für die Integration in Mammalia wird vorteilhaft lineare DNA verwendet. Die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bzw. des rekombinanten Nukleinsäurekonstrukts kann vorteilhaft durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Genexpression positiv beeinflussen, erhöht werden. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem stärkere Transkriptionssignale wie Promotoren und Enhancer verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert, oder die Ableseeffizienz dieser mRNA an den Ribosomen erhöht wird. Zur Erhöhung der Genkopienzahl können die Nukleinsäuresequenzen oder homologe Gene, beispielsweise in ein Nukleinsäurefragment bzw. in einen Vektor eingebaut werden, der vorzugsweise die den jeweiligen Genen zugeordnete, regulatorische Gensequenzen oder analog wirkende Promotoraktivität enthält. Insbesondere werden solche regulatorische Sequenzen verwendet, die die Genexpression verstärken. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können zusammen mit den für interagierende Proteine kodierenden Sequenzen in einen einzelnen Vektor kloniert werden und anschließend in dem gewünschten Organismus exprimiert werden. Alternativ kann auch jede der potentiell interagierenden Nukleinsäuresequenzen und die für m30 kodierenden Sequenzen in je einen einzelnen Vektor gebracht und diese getrennt in den jeweiligen Organismus über übliche Methoden wie Transformation, Transfektion, Transduktion, Elektroporation oder Partikel-Gun verbracht werden. Darüberhinaus kann das erfindungsgemäße

Nukleinsäurekonstrukt oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren auch in Form therapeutisch oder diagnostisch geeigneter Fragmente exprimiert werden. Zur Generierung des rekombinanten Proteins können Vektorsysteme oder Oligonukleotide verwendet werden, die die Nukleinsäuren oder das Nukleinsäurekonstrukt um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Als solche

"Tags" sind in der Literatur z. B. Hexa-Histidin -Anker bekannt oder Epitope, die als Antigene verschiedener Antikörper erkannt werden können (Studier et al., Meth. Enzymol., 185, 1990: 60 - 89 und Ausubel et al. (eds.) 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York).

[0021] Als Wirtszelle sind prinzipiell alle Zellen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate oder des rekombinanten Nukleinsäurekonstrukts ermöglichen. Unter Wirtszellen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Wirtszellen/Organismen sind Bakterien wie *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* oder *Pseudomonas*, eukaryotische Mikroorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, höhere eukaryotische Zellen aus Mensch oder Tier, beispielsweise COS-, HeLa-, HEK293-, Sf9- oder CHO-Zellen. Die Kombination aus dem Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren wie Plasmide, Viren oder Phagen wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter System, die Phagen 1, Mu oder andere temperante Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bilden ein Expressionssystem. Bevorzugt sind unter dem Begriff Expressionssysteme beispielsweise die Kombination aus Säugetierzellen wie CHO-Zellen und Vektoren wie pcDNA3neo-Vektor oder HEK293-Zellen und CMV-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen. Zellfreie, in vitro-Expressionssysteme kommen jedoch auch in Betracht.

[0022] Als erfindungsgemäße Wirte zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kommt auch Säugerewebe, Säugerorgane bzw nicht-humane transgene Säuger in Betracht Die genannten Wirte unterscheiden sich vom Wildtyp vorzugsweise dadurch, dass sie im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Menge des erfindungsgemäßen Proteins enthalten oder aber eine neue Proteinvariante der erfindungsgemäßen Protein-Kinase. Umfasst sind jedoch auch Wirtsorganismen, bei denen die natürlich vorkommende Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Protein kodiert entweder vollständig oder teilweise entfernt wurde oder so verändert wurde, dass sie transkriptionsinaktiv ist.

[0023] Vorzugsweise enthalten die genannten Organismen die erfindungsgemäße Nukleinsäure bzw. das erfindungsgemäße Konstrukt in einer Stelle des Genoms integriert, die nicht seiner natürlichen Position, wie im Wildtyp vorhanden, entspricht.

[0024] Als nicht-humane transgene Säuger kommen vorzugsweise Mäuse, Ratten, Schafe, Rinder oder Schweine in Betracht, wobei jedoch auch Nichtsäugerorganismen, wie Pflanzen, als Empfänger der erfindungsgemäßen Sequenzen in Betracht kommen. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out Tiere handeln. Dabei können die transgenen Tiere eine funktionelle oder nicht funktionelle erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder ein funktionelles oder nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt enthalten. Eine weitere erfindungsgemäße Ausgestaltung der oben beschriebenen transgenen Tiere sind nicht-humane transgene Tiere, in deren Keimzellen oder der Gesamtheit oder einem Teil der somatischen Zellen; oder in dessen Keimzellen und der Gesamtheit oder einem Teil der somatischen Zellen die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz durch gentechnische Verfahren verändert oder durch Einfügen von DNA-Elementen unterbrochen wurden. Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes der Nukleotidsequenz oder Teilen davon ist die Erzeugung transgener oder knock-out- oder konditioneller oder regionenspezifischer knock-out Tiere oder spezifischer Mutationen in gentechnisch veränderten Tieren (Ausubel et al. (eds.) 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York und Torres et al., (eds.) 1997, Laboratory protocols for conditional gene targeting, Oxford University Press, Oxford). Über transgene Überexpression oder genetische Mutation (Nullmutation oder spezifische Deletionen, Insertionen oder Veränderungen) durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen kann man Tiermodelle erzeugen, die wertvolle weitere Informationen über die Pathogenese der Apoplexie liefern können. Solchermaßen hergestellte Tiermodelle können essentielle Testsysteme zur Evaluierung neuartiger Therapeutika darstellen.

[0025] Die erfindungsgemäßen Proteine sind erhältlich durch Expression einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in einem geeigneten Expressionssystem, wobei vorzugsweise intakte Zellen umfassende Expressionssysteme in Betracht kommen. Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Protein ein Protein ausgewählt aus einem Protein mit einer der Sequenzen nach SEQ ID Nr. 5 - 8 oder einem Protein, das zu den genannten Sequenzen mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90% identisch ist. Dabei berechnet sich die "%-Identität" zu den Sequenzen nach SEQ ID Nr. 5 - 8 nach dem Algorithmus von Altschul et al., J. Mol. Biol, 250, 403 - 410, 1990. Das erfindungsgemäße Protein und funktionelle Varianten davon lässt sich jedoch auch aus dem Gehir von Mammalia wie *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* oder *Mus musculus* isolieren. Erfindungsgemäße Proteine sind auch solche, die sich von einem Protein nach einer der SEQ ID Nr. 5 - 8 durch Aminosäureaustausch ableiten, wobei die Protein-Kinase-Aktivität im Wesentlichen unverändert bleibt. Beispielsweise können Aminosäuren in dem Ausgangsprotein gemäß SEQ ID Nr. 5 - 8 durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität usw.) ersetzt werden. Beispielsweise können Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht werden. Es können aber auch eine oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht,

hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere der genannten Maßnahmen miteinander kombiniert werden. Die Maßnahmen zum Verändern einer vorgegebenen Aminosäuresequenz zu einer gewünschten Sequenz sind dem Fachmann geläufig.

[0026] Das Herstellen der erfindungsgemäßen Antikörper, die mit einem erfindungsgemäßen Protein reagieren, ist dem Fachmann bekannt. Zu diesem Zweck kann er beispielsweise auf das Herstellen von polyklonalen Antisera oder aber die Hybridom-Technologie zu Herstellung monoklonaler Antikörper zurückgreifen.

[0027] Erfindungsgemäße Inhibitoren sind solche niedermolekularen oder aber auch proteinartige Substanzen, die die Protein-Kinase-Aktivität des erfindungsgemäßen Proteins selektiv hemmen bzw. vollkommen ausschalten können. Das Identifizieren und Herstellen geeigneter Inhibitoren ist dem Fachmann unter Verwendung herkömmlicher Protein-Kinase-Assays zum Screenen von Substanzen ohne Weiteres möglich. Geeignete Screeningverfahren und Protein-Kinase-Assays werden unten beschrieben. Auch lassen sich geeignete Substanzen mit gewünschter Bindungsaffinität unter Einsatz der Computer-gestützten Wirkstoffentwicklung (CAD) identifizieren (Vergleich z.B. Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Verlag, Heidelberg). Die so identifizierten Inhibitoren der erfindungsgemäßen Protein-Kinase sind beispielsweise geeignet zur Prophylaxe und/oder Therapie des Schlaganfalls und anderer neurologischer (insbesondere neurodegenerativer) oder neoplastischer Erkrankungen. Für die genannten niedermolekularen Substanzen kommen als Inhibitoren auch Peptide und Proteine in Betracht, die eine spezifische Wechselwirkung mit dem erfindungsgemäßen Protein-Kinase-Inhibitor eingehen können. Solche Peptid- bzw. Proteininhibitoren lassen sich beispielsweise mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems oder aber auch anderen Assays identifizieren. Diese Assays erlauben die Eingrenzung der Aminosäuren, die für eine spezifische Wechselwirkung mit weiteren Interaktionspartnern verantwortlich sind. Ferner lässt sich das erfindungsgemäße Protein und dessen Protein-Kinase-Aktivität einfach in einem Testsystem austesten, wobei die Aktivität des Proteins in Anwesenheit der zu testenden Substanz gemessen wird. Hierbei handelt es sich vorzugsweise um einfache Meßmethoden (kolorimetrische, luminometrische, auf Fluoreszenz beruhende oder radioaktive Techniken), die die schnelle Messung einer Vielzahl von Testsubstanzen erlauben (vergleiche Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Verlag, Heidelberg). Die beschriebenen Testsysteme erlauben das Durchsuchen von chemischen Bibliotheken nach Substanzen, die hemmende oder aber auch aktivierende Wirkungen auf erfindungsgemäße Proteine haben. Mit diesen Inhibitoren lässt sich die Signaltransduktionskette, die bei Ischämie induziert wird und über das erfindungsgemäße Protein verläuft, hemmen. Dies ermöglicht das Hemmen bzw. Verhindern der ischämischen Folgeerscheinungen.

[0028] Mittels des oben erwähnten Two-Hybrid-Selektions-Systems lassen sich auch die Intrazellulären physiologischen Interaktionspartner der erfindungsgemäßen Protein-Kinase, wie das Phosphorylierungssubstrat, sowie die Kinase-Aktivität regulierende intrazelluläre Interaktionspartner identifizieren.

[0029] Mit Hilfe von Antikörpern kann die Proteinmenge und auch die Aktivität (z. B. spezifische Phosphorylierungen) der Proteine mit den Sequenzen der SEQ ID Nr. 5-8 bestimmt werden. Daher ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Quantifizierung der Proteinaktivität eines Proteins mit einer der Sequenzen SEQ ID Nr. 5-8. Ausgehend von den Aminosäuresequenzen nach SEQ ID Nr. 5-8 können synthetische Peptide generiert werden, die als Antigene für die Produktion von Antikörpern eingesetzt werden. Es ist auch möglich, das Polypeptid oder Bruchstücke davon zur Generierung von Antikörpern einzusetzen. Mit "Antikörpern" sind sowohl polyklonale, monoklonale, humane oder humanisierte oder rekombinante Antikörper oder Fragmente davon, single chain Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeint. Unter erfindungsgemäßen Antikörpern oder deren Fragmenten sind prinzipiell alle Immunglobulin-klassen wie IgM, IgG, IgD, IgE, IgA oder ihre Subklassen wie die Subklassen des IgG oder deren Mischungen zu verstehen. Bevorzugt sind IgG und seine Subklassen wie beispielsweise IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 oder IgGM. Besonders bevorzugt sind die IgG Subtypen IgG1/k oder IgG2b/k. Als Fragmente seien alle verkürzten oder veränderten Antikörperfragmente mit einer oder zwei dem Antigen-komplementären Bindungsstellen, wie Antikörperteile mit einer den Antikörper entsprechenden von leichter und schwerer Kette gebildeten Bindungsstelle wie Fv-, Fab- oder F(ab')₂-Fragmente oder Einzelstrangfragmente, genannt. Bevorzugt sind verkürzte Doppelstrangfragmente wie Fv-, Fab- oder F(ab')₂. Diese Fragmente können beispielsweise auf enzymatischem Wege durch Abspaltung des Fc-Teils der Antikörper mit Enzymen wie Papain oder Pepsin, durch chemische Oxidation oder durch gentechnische Manipulation der Antikörpergene erhalten werden. Auch genmanipulierte nichtverkürzte Fragmente können vorteilhaft verwendet werden. Die Antikörper oder Fragmente können allein oder in Mischungen verwendet werden. Die Antikörpergene für die gentechnischen Manipulationen lassen sich in dem Fachmann bekannter Weise, beispielsweise aus den Hybridomzellen, isolieren (Harlow, E. and Lane, D. 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; Ausubel et al., (eds), 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York). Dazu werden Antikörperproduzierende Zellen angezogen und die mRNA bei ausreichender optischer Dichte der Zellen über Zellyse mit Guanidiniumthiocyanat, Ansäuern mit Natriumacetat, Extraktion mit Phenol, Chloroform/Isoamylalkohol, Fällungen mit Isopropanol und Waschen mit Ethanol aus den Zellen in bekannter Weise isoliert. Anschließend wird mit Hilfe der Reversen Transcriptase cDNA aus der mRNA synthetisiert. Die synthetisierte cDNA kann direkt oder nach genetischer Manipulation beispielsweise durch "site directed mutagenesis", Einführung von Insertionen, Inversionen, Deletionen oder Basenaustausche in geeignete tierische, pilzliche, bakterielle oder virale Vektoren inseriert und in den entsprechenden Wirtsor-

ganismen exprimiert werden. Bevorzugt werden bakterielle oder Hefe-Vektoren wie pBR322, pUC18/19, pA-CYC184, Lambda oder Hefe-mu-Vektoren zur Klonierung der Gene und die Expression in Bakterien wie E. coli bzw. in der Hefe wie Saccharomyces cerevisiae. Spezifische Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Proteine können sich sowohl als diagnostische Reagenzien als auch als Therapeutika bei Erkrankungen eignen, bei denen das erfindungsgemäße Protein von pathophysiologischer Bedeutung ist.

[0030] Der erfindungsgemäße Diagnosekit enthält eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, oder ein Konstrukt enthaltend diese, ein erfindungsgemäßes Protein und/oder einen Antikörper, der für das erfindungsgemäße Protein spezifisch ist, sowie die weiteren Reagenzien, die üblicherweise Bestandteil diagnostischer Kits sind. Hierzu zählen geeignete Pufferlösungen und weitere Nachweisreagenzien.

[0031] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Diagnose eines Apoplexierisikos oder der Verlaufsbeurteilung eines Hirninfarktes wird die Patientenprobe mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure in Kontakt gebracht und die damit hybridisierende Nukleinsäure in der Patientenprobe bestimmt. Ein erhöhter Spiegel an Nukleinsäure, die mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure hybridisiert ist ein Indikator für ein erhöhtes Risiko des Auftretens einer Apoplexie. Alternativ zu dem Nachweis von Nukleinsäure in der Patientenprobe kann auch die Menge an erfindungsgemäßigem Protein als Indikator eines Apoplexierisikos bestimmt werden. Für den Proteinnachweis können beispielsweise die erfindungsgemäßen Antikörper herangezogen werden. Ein erhöhter Proteinspiegel in der untersuchten Patientenprobe ist ebenfalls ein Indikator für ein erhöhtes Apoplexierisiko. Diese Bestimmungen sind auch ohne weiteres quantitativ durchführbar, wobei die Negativkontrolle Material eines gesunden Patienten darstellt.

[0032] Ferner können die erfindungsgemäße Nukleinsäure sowie das davon kodierte Protein bzw. Oligonukleotide und Peptide hiervon sowie dagegen gerichtete Antikörper zur Diagnose weiterer Erkrankungen, insbesondere neurologischer oder kardiovaskulärer oder immunologischer oder Tumorerkrankungen, verwendet werden. Ferner können diese Materialien für die Diagnose von genetischen Prädispositionen für bestimmte neurologische, neoplastische, kardiovaskuläre und immunologische Erkrankungen herangezogen werden. Weiterhin lässt sich mit diesen Materialien ein Monitoring der Behandlung der genannten Erkrankungen durchführen.

[0033] Ein Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einer biologischen Probe, umfasst folgende Schritte: a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer bekannten Menge an erfindungsgemäßer Nukleinsäure oder einer bekannten Menge an Oligonukleotiden, die als Primer für eine Amplifikation der erfindungsgemäßen Nukleinsäure geeignet sind, b) Nachweis der erfindungsgemäßen Nukleinsäure durch spezifische Hybridisierung oder PCR-Amplifikation, c) Vergleich der Menge an hybridisierender Nukleinsäure oder an durch PCR Amplifikation gewonnener Nukleinsäure mit einem Mengenstandard. Ein Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis eines erfindungsgemäßen Proteinheteromers oder eines erfindungsgemäßen Proteins in einer biologischen Probe umfasst folgende Schritte: a) Inkubation einer biologischen Probe mit einem Antikörper, der spezifisch gegen das Proteinheteromer oder gegen das erfindungsgemäße Protein gerichtet ist, b) Nachweis des Antikörper / Antigenkomplexes, c) Vergleich der Mengen des Antikörper/Antigenkomplexes mit einem Mengenstandard. Als Standard wird üblicherweise eine biologische Probe aus einem gesunden Organismus entnommen. Insbesondere kann hier die unten ausgeführte Eigenschaft der Nukleinsäure gemäß SEQ ID Nr. 1 - 4 benutzt werden, nach bestimmten pathophysiologischen Stimuli, wie z.B. cerebralen I-schämien, hochreguliert zu werden. Dies betrifft z.B. die Verlaufsbeurteilung von Krankheiten (wie z.B. des Schlaganfalls), die Beurteilung von Therapieerfolgen, die Graduierung einer Krankheit.

[0034] Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung enthält eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein Konstrukt enthaltend diese, eine Wirtszelle enthaltend die genannten Gegenstände, ein erfindungsgemäßes Protein, einen dagegen gerichteten Antikörper und/oder einen erfindungsgemäßen Inhibitor gegebenenfalls zusammen mit den üblichen Hilfs- und Trägerstoffen.

[0035] Therapeutische Anwendungen der erfindungsgemäßen Gegenstände betreffen die Modulation von Prozessen, die mit der Phosphorylierung von körpereigenen Proteinen zusammenhängen. Hierzu zählen auch die folgenden physiologischen bzw. pathophysiologischen Vorgänge: Beeinflussung immunologischer Aktivierungsprozesse (z.B. Aktivierung von Monozyten, T-Zellen); die Beeinflussung von Zelltodprozessen, z.B. Kaskaden, die zu Zelltod führen, oder von Prozessen, die zu ungehemmtem Wachstum führen. Zu den behandelbaren Zelltypen zählen insbesondere neurale Zellen, Tumorzellen und Zellen des Immunsystems. Schließlich lässt sich mit den erfindungsgemäßen Materialien die Zellinteraktionen, an denen Protein-Kinasen beteiligt sind, z.B. die Zellteilung, Zelldifferenzierung, Plastizität und Regeneration beeinflussen.

[0036] Die erfindungsgemäße Nukleinsäure sowie das Konstrukt enthaltend diese, die entsprechenden wirtszellen sowie das erfindungsgemäße Protein, der erfindungsgemäße Antikörper und/oder der erfindungsgemäße Inhibitor können insbesondere zur Prophylaxe und/oder Therapie neurologischer, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt werden. Hierzu zählen insbesondere Schlaganfall, Multiple Sklerose, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose, Heterodegenerative Ataxien, Morbus Huntington, Neuropathien und Epilepsien.

[0037] Ebenso können bevorzugt damit Tumorerkrankungen diagnostiziert/therapiert werden. Beispiele für solche Tumorerkrankungen sind z.B. Kolonkarzinome, Rhabdomyosarkome, Bronchialkarzinome.

[0038] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren lassen sich auch im Rahmen der Gentherapie bei Säugern und insbe-

sondere den Menschen einsetzen. Bei der Gentherapie können die erfindungsgemäßen Sequenzen entweder in den Körper oder Teile davon eingebracht werden oder die Expression der körpereigenen Sequenzen kann reguliert werden, wie beispielsweise mittels der Antisense-Technologie. Zu diesem Zweck können Oligonukleotide, z.B. mit Antisinnorientierung oder Hybrid-RNA-DNA-Oligonukleotide, die erfindungsgemäße Sequenzen enthalten, benutzt werden. Ferner können virale Konstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Sequenz, eingesetzt werden. Schließlich kann nackte DNA, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, eingesetzt werden.

[0039] Die in den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren identifizierten SNPs sind ebenfalls in der Diagnose unter Erforschung humaner Erbkrankheiten nützlich. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können dazu verwendet werden, weitere Gene für homologe mRNAs im murinen und im menschlichen Genom mit gängigen Methoden durch Homologiescreening zu isolieren und zu charakterisieren und mit bereits bekannten Markern für humane Erbkrankheiten zu korrelieren. Dies ermöglicht die Identifizierung weiterer Gene als Ursache für bestimmte Erbkrankheiten.

Figurenbeschreibung

[0040]

Fig. 1 zeigt das Prinzip des Restriction-mediated Differential Display (RMDD)-Verfahrens.

Fig. 2 Gewebeverteilung des erfindungsgemäßen Proteins in der Ratte:

Die obere Abbildung zeigt einen Northern-Blot der mit einer Maussonde aus dem 3'-Bereich der SEQ ID Nr. 1 erhalten wurde. Die untere Abbildung zeigt die Ethidiumbromidfärbung des im oberen Teil gezeigten RNA-Gels.

Es wird eine einzige Bande von der Probe detektiert. Die weitaus stärkste Expression des erfindungsgemäßen Proteins zeigt sich im Gehirn; in Testis und Lunge finden sich ebenfalls noch deutliche Transkripte, während die anderen Gewebe nur sehr schwache Banden aufweisen.

Fig. 3 zeigt die Gewebeverteilung des erfindungsgemäßen Proteins beim Menschen.

Gezeigt ist eine quantitative PCR mit Hilfe des Light-Cycler-Systems und der Benutzung des MTC (multiple tissue cDNA) Kits der Firma Clontech. Die stärkste Expression befindet sich im Gehirn und der Lunge und den Intestinalorganen.

Fig. 4 zeigt die Induktion des erfindungsgemäßen Proteins durch fokale cerebrale Ischämie.

Gezeigt ist die Quantifizierung von 9B5 mRNA mit Hilfe des Light-Cycler-Systems nach Induktion einer fokalen cerebralen Ischämie an Mäusen. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure wird zwei Stunden nach einer ischämischen Episode hochreguliert. Sechs Stunden nach Ischämie ist diese Induktion nicht mehr nachweisbar.

Fig. 5 zeigt die Induktion des erfindungsgemäßen Proteins durch fokale cerebrale Ischämie (in situ Hybridisierung von Mausgehirn)

Gezeigt ist eine in situ-Hybridisierung von 9B5 nach Induktion einer fokalen cerebralen Ischämie an Mäusen. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure wird zwei Stunden nach einer ischämischen Episode hochreguliert (linke = ischämische = induzierte Seite). Man sieht ausserdem, dass 9B5 in Neuronen exprimiert wird. Besondere Induktion findet man im Kortex und im hippocampalen Gebiet.

Fig. 6 zeigt die katalytische Region der SEQ ID Nr. 7. Dabei besitzen die Symbole folgende Bedeutung: I = Phosphatanker, VIb = katalytische Region, VII - VIII = Aktivierungsloop, V-XI = katalytische Domäne mit Subdomänen (nach Hanks und Hunter, 1995, FASEB J., 9, 576-596); * = Aktivierungsstelle, A = ATP-Bindungsstelle; C = aktives Zentrum.

Fig. 7 zeigt den physiologischen Baum zu homologen Protein-Kinasen. H9B5 ist das phylogenetisch jüngste Protein und am engsten verwandt zu P78/c-TAK 1. Klar gezeigt ist auch die frühe Abspaltung des C.elegans-Proteins Par-1.

Fig. 8 zeigt den Domänenaufbau von 9B5.

Fig. 9 ist ein Hydrophobizitätsblot nach Kyte-Doolittle.

Fig. 10 zeigt die genomische Struktur von 9B5 beim Menschen.

EP 1 282 700 B1

Gezeigt sind die 18 Exone des 9B5-Gens. Exon 16 unterliegt differenziellem Spleißen. Die Variante 9B5 entsteht ohne Exon 16; die Variante 9B5A enthält Exon 16.

Proteinsequenz von 9B5

5 [0041] Die murinen Proteinsequenzen (SEQ ID Nr. 5 und 6) sind am 5' Ende unvollständig. Bei den humanen Sequenzen gemäß SEQ ID Nr. 7 und 8 handelt es sich um Voll-längen-Klone. Dies ergibt sich auch aus Alignments mit homologen Protein-Kinasen.

10 [0042] Für h9B5 (SEQ ID Nr. 7) ergibt sich ein offenes Leseraster, das für ein Protein mit 752 Aminosäuren kodiert (82.5 kD Molekulargewicht; isoelekt. Punkt bei pH 9,7). Das Programm PSORT II ergibt keine signifikanten Signalsequenzen, und sagt keine Transmembranbereiche vorher. Ein Kyte-Doolittle Hydrophobizitätsplot (Fig. 9) zeigt ebenfalls einen hohen Anteil an hydrophilen Bereichen und nur einen grösseren hydrophoben Bereich (ca. AS 240-255), der jedoch nicht ausreichend hydrophob für eine Transmembranregion scheint (Index > -3). Interessant ist jedoch in diesem Zusammenhang die berichtete membranassoziierte Lokalisation von einigen verwandten Proteinen (p78/c-TAK1, par1).

15 [0043] Für die Sequenz h9B5_b (SEQ ID Nr. 8) ergibt sich ein offenes Leseraster von 688 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 75,3 kD und einem isoelektrischen Punkt bei pH 9,8. Durch die Insertion von Exon 16 findet eine Rasterverschiebung statt, die zu einem früheren Translationsstopp führt.

Klassifizierung von 9B5

20 [0044] Ein Vergleich mit bekannten Protein-Kinasen erlaubt die Zuordnung des erfindungsgemäßen Proteins zu der Subgruppe "CaMK Gruppe II" nach Hanks (http://www.sdsc.edu/Kinases/pkr/pk_catalytic/pk_hanks_seq_align_long.html), (Vergleich Hanks and Lindberg, *Methods Enzymol*, 200, 525-32, (1991); Hanks and Hunter, *Faseb J*, 9, 576-96, (1995))). Drewes et al. (Drewes, et al., *Cell*, 89, 297-308, (1997)) postulierten bereits für MARK1/MARK2 und p78 eine neue Subgruppe in der bereits definierten SNF1/AMPK Subgruppe der CaMKII Gruppe. Nach dem Alignment der am stärksten homologen Proteine (9B5, Par1, cTAK1/p78, MARK1, EMK) und dem phylogenetischen Baum (Fig. 7) besteht die Möglichkeit, dass 9B5 eine neue Subgruppe definiert. Am Carboxyterminus weicht 9B5 stark von den anderen Protein-Kinasen ab. Die in dieser Gruppe befindlichen Kinasen zeichnen sich durch eine stark konservierte carboxyterminale Domäne aus, die mit der Sequenz "ELKL" endet. Deshalb wurde EMK auch als "ELKL-motif kinase" bezeichnet. Es ist davon auszugehen, dass noch Protein-Kinasen existieren, die 9B5 im Carboxyterminus ähnlich sind, und die sich über Homologiescreens identifizieren lassen. Eine Suche mit dem Programm "tblastn" gegen die EMBL-Nucleotiddatenbank ergab bislang keine Hinweise auf bereits bekannte Homologe im Carboxyterminusbereich.

25 [0045] Weiter ist aus der Veröffentlichung WO9801756 die Protein Kinase TcAK1 mit etwa 67 % Identität in der codierenden Region mit 9b5 (SEQ ID NO:1) bekannt.

30 [0046] Das physiologische Substrat des erfindungsgemäßen Proteins können Proteine mit der Zielsequenz KXGS und/oder KVGS sein. Demzufolge kann das Tauprotein oder die Proteine MAP1 und 2 ein physiologisches Substrat der erfindungsgemäßen Protein-Kinase darstellen.

Subdomänen der katalytischen Domäne: 9B5 ist eine Serin-Threonin-Protein-Kinase

40 [0047] Eindeutig lassen sich über Vergleiche mit anderen Protein-Kinasen die wichtigen katalytischen Subdomänen definieren (siehe Fig. 6). Ebenso lassen sich die Aktivierungsstellen aufzeigen (ein Threonin und ein Serin die phosphoryliert werden können; pos. 211 und 215 in h9B5, Fig. 6). Eine Mutation dieser Aminosäuren z.B. zu Alanin führt zu einer konstitutiven Inaktivierung. Ebenso führt die Mutation des Lysinrestes (ATP-Bindung) in Subdomäne II (siehe Fig. 6) zu einer Inaktivierung. Diese Kenntnis kann für weitere Experimente benutzt werden, z.B. unter Benutzung dominant negativer Effekte. Eine Mutation von Pos. 211 (Ser) und 215 (Thr) zu Glutamat oder Aspartat sollte zu konstitutiver Aktivierung führen, da die negativ geladenen Gruppen eine Phosphorylierung imitieren können (Huang and Erikson, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8960-3, (1994)). Diese Mutanten können für Überexpression der spezifischen Kinase-Aktivität in Zellen oder transgenen Tieren ausgenutzt werden.

45 [0048] Von Subdomäne I ist bekannt, dass sie als eine Art Klammer wirkt, die die nichttransferierbaren Phosphatgruppen von ATP verankert. Dabei passt die Peptidsequenz GKGNFQKV in 9B5 gut zum Konsensusmotiv GXGXGXV (Hanks and Hunter, *Faseb J*, 9, 576-96, (1995)). In der Subdomäne II ist v.a. das Lysin (markiert mit "A" in Fig. 6) wichtig; dieses verankert und orientiert die alpha- und beta-Phosphate von ATP und ist essentiell für die Enzymfunktion. Subdomäne VIb ist durch die Konsensussequenz HRDLKXXN charakterisiert. Diese ist auch in 9B5 sehr gut konserviert: HRDLKAEN.

50 [0048] Dabei ist das Aspartat (D) wahrscheinlich der Protonenakzeptor für die angreifende Hydroxylgruppe während der Phosphotransferreaktion (Hanks and Hunter, *Faseb J*, 9, 576-96, (1995)). Subdomäne VII bildet mit Mg²⁺-Ionen einen Chelatkomplex, der das gamma-Phosphat einschliesst und somit diese Gruppe für den Transfer orientiert. Praktisch

invariabel ist die Sequenz DFG. Ebenso erhalten ist die konservierte Sequenz APE in Subdomäne VIII. Diese Domäne ist für die Peptiderkennung zuständig. Hier können auch Inhibitorpeptide binden. Viele Protein-Kinasen werden durch Phosphorylierung innerhalb dieser Subdomäne aktiviert. Diese Domäne ist vollständig konserviert in EMK, p78 und MARK1. Bei MARK1 wurde durch direkte Sequenzierung bereits gezeigt, dass Threonin (T) und Serin (S) phosphoryliert werden können, und MARK1 dadurch aktiviert wird. Es kann wegen dieser Konservierung mit höchster Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass 9B5 ebenfalls an diesen Stellen phosphoryliert und damit reguliert werden kann. Möglicherweise findet Autophosphorylierung statt, eine Aktivierung durch eine andere Kinase ist auch denkbar. Möglicherweise ist auch das Tyrosin (Y) in dieser Domäne eine Phosphorylierungsstelle (wie z.B. bei Erk1/2). Subdomäne IX ist ebenfalls an der Peptidbindung beteiligt (hydrophobe Wechselwirkung).
Aufgrund dieser Strukturentwicklung kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass 9B5 eine aktive Protein-Kinase (Serin-Threonin-Kinase) ist.

Gewebeexpression von 9B5

[0049] Die Gewebeexpression von 9B5 wurde bei der Maus und beim Menschen untersucht. Bei der Maus wurde ein "multiple tissue northern" mit verschiedenen Geweben durchgeführt (Fig. 2). Als Probe wurde ein Fragment aus dem 3' Bereich der Maus cDNA verwendet. Hier findet sich Expression in Gehirn, Hoden und Lunge.

[0050] Beim Menschen wurde initial ein "multiple tissue northern" (Clontech) mit 2 verschiedenen Sonden (aus dem 3' und aus dem 5' Bereich) durchgeführt. Es war jedoch kein deutliches Signal zu erhalten, was auf das geringe Vorkommen von 9B5 beim Menschen zurückgeführt wurde. Deshalb wurde eine quantitative PCR mit Hilfe des Light-Cyclers (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Es wurden cDNA-Proben von 8 humanen Geweben verwendet, die bereits mengenstandardisiert auf 4 verschiedene Housekeeping Gene sind (Fa. Clontech). Als Kontrolle verwendet wurde Plasmid h9B5-663, das ein amplifiziertes Fragment humaner 9B5-cDNA enthielt. Als PCR-Programm wurde ein touch-down-Protokoll gewählt. Es fand in allen Gewebeproben Amplifikation eines Produktes mit dem Schmelzpunkt 90°C statt, dieser deckte sich mit der Kontroll-PCR. Eine darauffolgende Gelanalyse der Fragmente erbrachte ein Produkt von ca. 660 bp, also die erwartete Größe. 9B5 beim Menschen ist tatsächlich nicht sehr stark exprimiert, die Amplifikation wird im LightCycler erst um Zyklus 32 sichtbar. Folgende Primer wurden verwendet:

seq_h9b5_s1 GTTGCCATCAAGATTATC (in Exon 3)
seq_h9b5_a4 CATGATTTGCTCGAGAGTAC (in Exon 9)

Die quantitative Analyse (Fig. 3) zeigt eine relativ ubiquitäre Gewebeverteilung mit Schwerpunkten in Gehirn und Lunge, Leber, Niere und Pankreas.

Regulation durch fokale cerebrale Ischämie, einem Schlaganfallmodell

[0051] Die erfindungsgemäße Serin-Threonin-Kinase 9B5 wurde durch ein Verfahren zur Klonierung differentiell regulierter Gene (RMDD) in der ischämischen Hemisphäre von Mäusen nach fokaler cerebraler Ischämie identifiziert. Das Tiermodell der fokalen cerebralen Ischämie stellt ein valides Modell für den humanen ischämischen Schlaganfall dar. Zur Herbeiführung der fokalen cerebralen Ischämie wurde das sog. Fadenmodell benutzt, bei dem ein beschichteter Nylonfaden durch die A. carotis interna an den Abgang der A. cerebri media vorgeschoben wird und einen ischämischen Schlaganfall induziert (Clark, et al., Neurol. Res., 19, 641-648, (1997)). Die Regulation der Genexpression spielt bei der cerebralen Ischämie eine entscheidende Rolle für den Ablauf und das Ausmass des Neuronenschadens (*Koistinaho and Hokfelt, Neuroreport, 8, i-viii, (1997, Schneider, et al., Nat Med, 5, 554-9, (1999))*). Insbesondere "immediate early" Gene spielen hier eine Rolle (Atkins, et al., Stroke, 27, 1682-1687, (1996)), wie z.B. cox-2, (Nogawa, et al., J. Neurosci., 17, 2746-2755, (1997)).

[0052] Die 9B5 Expression wurde nach einer fokalen cerebralen Ischämie in drei Zeitverläufen untersucht: Zum einen in einer transienten Ischämie nach zwei Reperfusionzeiten (90 min Ischämie, 2 h und 6 h Reperfusion), und zum anderen in einer permanenten Ischämie von 24 h (Fig. 4). RNA wurde aus den beiden Hemisphärenhälften von 3-4 Gehirnen ohne Hirnstamm und Kleinhirn gewonnen (Fasttrack kit, Invitrogen). Mit Hilfe des LightCycler™ Systems (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Der cDNA Gehalt der Proben wurde auf die Expression von Cyclophilin und S20 normiert (Schneider, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 4447-51, (1995)). Benutzte Primer zur Amplifikation von Cyclophilin waren:

cyc5 ACCCCACCGTGTCTTCGAC
acyc300 CATTGGCCATGGACAAGATG
und zur Amplifikation von Maus 9B5:
9_B5_(1)_1s TATGATCGAACCTCCTTCATGCC

9_B5_(1)_1a ATGTCCAGAACTGGGCCTAGCG (Diese Primer amplifizieren ein Amplimer von 556 bp, das am 3' Ende der Maus-cDNA liegt).

[0053] Tatsächlich zeigt sich eine deutliche Hochregulation um den Faktor 7-8 von 9B5-RNA auf der ischämischen (linken) Hirnhälfte 2h nach dem ischämischen Ereignis (middle cerebral artery occlusion von 90 min und 2 h Reperfusion; (Fig. 4); die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen, diese ergeben sich aus Messungen mit 3-fach seriell verdünnten cDNA-Proben und spiegelt damit die Zuverlässigkeit der Messergebnisse dar). Nach 24 h (in einem permanenten Modell) hingegen konnte kein Unterschied mehr festgestellt werden.

[0054] Ebenfalls durchgeführt wurde eine *in-situ*-Hybridisierung mit einer 1,6 kb langen Sonde aus dem 3' Bereich der Maus-9B5-cDNA (jeweils sense und antisense). Es wurde dabei im Wesentlichen nach dem Protokoll der Firma Roche Diagnostics (Digoxigeninsystem) nach Modifikationen von Rossner et al. (Mol Cell Neurosci, 9, 460-475, (1997)) verfahren. Es zeigt sich eine deutliche Induktion auf der ischämischen Seite (links) besonders in Neuronen der hippocampalen Region und des Cortex, geringer im Thalamus (Fig. 5).

[0055] Ebenso wird deutlich, dass 9B5 überwiegend in Neuronen exprimiert wird, und dort einer Regulation unterliegt.

[0056] Dies zeigt, dass 9B5 eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Schlaganfalls spielt. Die Hochregulation von 9B5 hierbei eine ähnliche Rolle wie z.B. bei bekannten Serin-Threonin-Kinasen (z.B. JNK, p38).

[0057] Eine Vielzahl an Serin-Threonin-Kinasen sind an Zelltodprozessen beteiligt (z.B. ASK1 (Tobiome, et al., Biochem Biophys Res Commun, 239, 905-10, (1997), Berestetskaya, et al., J Biol Chem, 273, 27816-23, (1998), Chen, et al., Oncogene, 18, 173-80, (1999)), DAP (Inbal, et al., Nature, 390, 180-4, (1997), Levy-Strumpf and Kimchi, Oncogene, 17, 3331-40, (1998)), DRAKs (Sanjo, et al., J Biol Chem, 273, 29066-71, (1998)), ZIP (Kawai, et al., Mol Cell Biol, 18, 1642-51, (1998)), DRP-1 (Inbal, et al., Mol Cell Biol, 20, 1044-54, (2000)).

[0058] Diese Hochregulation ist ein Beweis für einen neuen transkriptionellen Regulationsmechanismus bei Protein-Kinasen, und bislang das einzige bekannte Beispiel dafür im Säugetiersystem. Interessanterweise fand sich erst jüngst die Hochregulation mehrerer MAP-Kinasen in einer systematischen Untersuchung des Hefetranskriptoms (Roberts, et al., Science, 287, 873-80, (2000)). Dies könnte einen neuen generellen Mechanismus zur Regulation von Protein-Kinasen darstellen.

Pharmakologische Bedeutung von 9B5 in neurodegenerativen, neoplastischen und anderen Erkrankungen

[0059] In jüngerer Zeit gewinnen Ansätze zur Inhibierung / Beeinflussung von Signaltransduktionswegen "downstream" eines membranständigen Rezeptors in der pharmakologischen Forschung zunehmend Bedeutung. Diese Ansätze werden wahrscheinlich in Zukunft einen wichtigen Anteil in der Therapie humaner Erkrankungen haben, insbesondere bei bis jetzt schlecht oder nicht therapierbaren Erkrankungen (Kletsas and Papavassiliou, Exp. Opin. Invest. Drugs, 8, 737-746, (1999)). Vorteile dieser Ansätze sind, dass sie erstens Ereignisse beeinflussen können, die von mehreren Stimuli hervorgerufen werden können, und eine gemeinsame Endstrecke haben; zweitens, dass zelluläre Ereignisse zeitlich nach dem auslösenden Stimulus liegen, und deshalb länger einer Intervention zugänglich sind.

[0060] Beispiele für erfolgreiche Eingriffe in solche Signalkaskaden sind beispielsweise Inhibitoren für Caspasen, die Apoptoseprozesse noch längere Zeit nach einem auslösenden Stimulus blockieren können. Besondere Aufmerksamkeit hat auch der Transkriptionsfaktor NF-kappaB und diesen aktivierende Prozesse gefunden. Beispielsweise wurde die Klonierung der 1-kappaB-Kinasen mit dem Ziel verfolgt, spezifische Inhibitoren für NF-kappaB vermittelte Gentranskription zu finden. Differentielle Transkriptionsprofilierungen gewinnen in der Pharmaforschung zur Identifizierung möglicher neuer Ansatzpunkte für Pharmaka in letzter Zeit grosse Bedeutung. Transkriptionelle Regulation, d.h. Regulation der mRNA-Menge eines Gens in der Zelle, ist ein wesentlicher Schritt für die Reaktion der Zelle auf Stimuli, neben Proteinphosphorylierungen, Proteindegradation etc. 9B5 unterliegt offensichtlich einer sehr raschen Regulation durch transkriptionelle Aktivierung, wie oben gezeigt wurde. Oft sind solche schnell regulierten Gene an kritischen Schlüsselstellungen für zelluläre Vorgänge beteiligt.

[0061] Eine pharmakologische Beeinflussung von 9B5 ist wie folgt möglich: 1. eine Beeinflussung der Transkriptmenge in der Zelle, beispielsweise die Suppression der schnellen Hochregulation nach pathologischen Prozessen (z.B. mittels Antisense-Technologie); 2. die Inhibierung der enzymatischen Aktivität von 9B5, im Besonderen der Kinase-Aktivität (z.B. mittels eines Kinase-Inhibitors; 3. die Inhibierung einer Interaktion mit einem oder mehreren anderen Molekülen, z.B. downstream befindlichen Protein Kinasen, oder Adaptoren.

In jüngster Zeit wurden spezifische Inhibitoren gegen einige MAP-Protein Kinasen entwickelt. Ein Beispiel dafür ist PD98059, ein Inhibitor von MEK1. Dieser verhindert die Phosphorylierung von Tau durch die Stimulation mit beta-amyloid. Dies hat mögliche Bedeutung für die Therapie der Alzheimer'schen Erkrankung.

[0062] Die Antitumorsubstanz UCN-01 ist ein Inhibitor der cdc25c-Phosphorylierung (Graves, et al., J Biol Chem, 275, 5600-5, (2000)).

[0063] Inhibitoren der erfindungsgemäßen Protein-Kinase lassen sich einfach mit herkömmlichen Protein-Kinase-Assays identifizieren und stellen ein wirksames Mittel zum Bekämpfen der Folgeerscheinungen cerebraler Ischämie dar.

[0064] Die experimentellen Daten über 9B5 belegen dessen zentrale Beteiligung an Vorgängen, die mit neuronalem Zelltod, Excitation, Plastizität und Neurogenese zusammenhängen. Das erfindungsgemäße Protein stellt ein wichtiges Zielmolekül für die Hemmung bzw. Verringerung der Folgeerscheinungen einer fokalen Ischämie dar. Neben dieser zentralen Rolle bei der Entstehung von Apoplexie als Folge fokaler Ischämie könnte das erfindungsgemäße Protein auch ein wichtiges Zielmolekül bei der Behandlung neoplastischer Erkrankungen, wie Krebs, darstellen. Auch hier könnte das erfindungsgemäße Protein bzw. sein Gen das Zielmolekül für Antikrebsmittel darstellen. Ebenso könnte das Gen eine wichtige Rolle bei Diagnose und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen sein, da es einige gemeinsame Mechanismen bei ischämisch bedingten Krankheiten gibt.

[0065] Bei einer besonders bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform wird zur Prophylaxe und Therapie des Schlaganfalls der Spiegel bzw. die Aktivität der erfindungsgemäßen Protein-Kinase gesenkt. Dies kann beispielsweise auf der Ebene der Expression erfolgen, indem die Expression/Translation der entsprechenden Nukleinsäuren gehemmt bzw. erniedrigt wird, oder auf der Ebene der Proteinaktivität erfolgen, indem die Protein-Kinase-Aktivität durch geeignete Inhibitoren erniedrigt bzw. gehemmt wird.

[0066] Die erfindungsgemäße Nukleinsäure und das hiervon kodierte Protein eröffnen neue Therapieansätze. So kann beispielsweise der Spiegel der endogenen Nukleinsäure beeinflusst werden, indem entweder direkt auf deren Transkription Einfluß genommen wird oder aber deren Translation zu erfindungsgemäßigem Protein beeinflusst wird. Hierfür kommen beispielsweise gentherapeutische Ansätze in Frage, bei denen mittels Co-Suppression oder Antisense-Technologie die Translation endogener Transkripte erniedrigt wird. Auch bieten sich neue Ansätze auf Ebene der Proteinaktivität, indem das erfindungsgemäße Protein beispielsweise das Zielmolekül von pharmazeutischen Wirkstoffen darstellt. So lassen sich mittels pharmazeutischer Wirkstoffe die Aktivität der erfindungsgemäßen Proteinkinase modifizieren, um so in den Mechanismus der Apoplexie regulierend einzugreifen. Eine Klasse solcher pharmazeutischer Wirkstoffe stellen die oben erwähnten Proteinkinaseinhibitoren dar. Grundsätzlich ermöglicht also die Bereitsstellung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. des erfindungsgemäßen Proteins vollkommen neue Wege der Prophylaxe bzw. Therapie des Schlaganfalls.

[0067] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

BEISPIELE

Beispiel 1

Molekulare Klonierung von 9B5

Herbeiführen des Fadenmodells in Mäusen

[0068] Zum Herbeiführen einer fokalen cerebralen Ischämie in c57/bl6 Mäusen wurden 3 Monate alte Mäuse benutzt. Nach Herbeiführen einer Inhalationsnarkose (70% N₂O, 30% O₂, 0,8 - 1 % Halothan) wurde ein 5-0 Prolenefaden (Fa. Ethicon), der mit 0.1 % Poly-L-Lysin beschichtet war, über die A. carotis externa in die A. carotis interna bis zum Abgang der A. cerebri media vorgeschoben. Die richtige Position des Fadens wird durch einen Abfall des Laser-Doppler-Signals (Fa. Perimed) auf 10 - 20% des Ausgangssignals angezeigt. Nach Durchführung dieser Operation und gegebenenfalls Bestimmung zusätzlicher physiologischer Parameter (Blutdruck, Puls, Blutgase, Blutglukose) erwachen die Mäuse aus der Narkose. Nach bestimmten Okklusionszeiten werden die Mäuse wieder einer Narkose unterzogen, und der Faden zurückgezogen. Dadurch findet eine Reperfusion des Gewebes statt. Nach bestimmten Reperfusionenzeiten werden die Mäuse durch Genickbruch getötet, und das Gehirn sofort präpariert und auf Trockeneis weggefroren.

[0069] Im vorliegenden Fall wurden keine Reperfusionen durchgeführt, sondern nur eine Okklusion von 90 min bzw. 24 h.

Präparation von mRNA aus den Hirnen

[0070] Dazu wurde das mRNA Präparationskit von der Fa. Invitrogen (Fasttrack) verwendet.

Durchführung des RMDD Protokolls (siehe auch Fig. 1)

[0071] Dabei wurde im wesentlichen nach Pat. Nr. EP 0 743 367 A2; US 5,876,932 verfahren, mit der Änderung, dass 2 µg polyA-RNA für die Erststrangsynthese eingesetzt wurden. Nach Durchführung von Erststrang-, Zweitstrangsynthese, Mbol-Restriktion wird eine Ligation mit Adaptoren durchgeführt. Zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen mit Subsets von Primerkombinationen schliessen sich an. Die PCR-Reaktionen werden danach auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel geladen und auf eine Nylonmembran gebロットet (Fa. GATC). Die biotin-markierten Banden werden mit Hilfe einer gebräuchlichen Streptavidin-Peroxidase-Reaktion visualisiert. Auf das Gel wurden jeweils PCR-Proben

von der ischämischen und kontralateralen Hemisphäre zusammen aufgetragen (24 h MCAO rechts und links und 90 min MCAO rechts und links). Banden unterschiedlicher Intensität in der rechten oder linken Hemisphäre werden ausgeschnitten, und eine Reamplifikation des entsprechenden PCR-Produktes durchgeführt. Erhaltene amplifizierte Produkte werden in den TOPO TA Vektor pcDNA 2.1 (Fa. Invitrogen) kloniert und mit T7 und M13rev-Primern sequenziert (ABI 3700 Kapillarelektrophoresesequencer).

Klonierung von 9B5

[0072] Bei Durchführung dieses Verfahrens fiel eine Sequenz auf, die nach 90 min auf der ischämischen Seite hochreguliert schien. Diese wurde 9B5 genannt. Eine Lightcycler-Analyse bestätigte eine schnelle Regulation nach MCAO (90 min MCAO und 2 h Reperfusion) (Fig. 4).

[0073] Das isolierte 3'-gelegene PCR-Fragment wurde benutzt, um eine Maushimbank zu hybridisieren. Dabei fanden sich mehrere Klone, die Sequenzteile von SEQ ID Nr. 1 und SEQ ID Nr. 2 enthielten. Eine Maus Probe aus dem 5'-Bereich wurde benutzt, um eine humane fetale Himbank in lambdaZapll (Stratagene) zu screenen. Dabei ergaben sich aus mehreren Klonen ebenfalls 2 verschiedene Sequenzen, die vermutlich Spleissvarianten desselben Gens darstellen (SEQ ID Nr. 3 und 4). Im Folgenden ist die detaillierte Herstellung der benutzten humanen cDNA-Bibliothek aufgeführt:

Herstellung der humanen cDNA-Bibliothek

[0074] Mit dem cDNA-Synthese Kit der Fa. Stratagene wurde ausgehend von 2 µg humaner fötaler Gehirn-mRNA (Fa. Clontech) und von 5 µg mRNA aus adultem Mausgehirn entsprechende cDNA-Bibliotheken hergestellt. Dabei wurde im wesentlichen entsprechend der Angaben des Herstellers verfahren. Zur Synthese der Erststrang cDNA wurde nach den Herstellerangaben ein oligoT-Primer verwendet. Die klonierungs-kompatiblen (E-coRI/XhoI) doppel-strängigen cDNA Fragmente wurden gröÙenselektioniert (nach Herstellerangaben/ Fa. Stratagene) und in den Plasmidvektor pBluescript SKII (Stratagene) ligiert. Die Ligation wurde durch Elektroporation in E.coli (DH10B, Gibco) transformiert und auf LB-Ampizillin Agar-Platten amplifiziert. Die Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse und Ionenaustauscher-Chromatographie isoliert (QIAfilter-Kit, Fa. Qiagen).

Die Komplexität an Einzelklonen betrug für die fetale humane Gehirn cDNA-Bank 4 Millionen. Von jeder cDNA-Bank wurden zufällig 24 Einzelklone nach Insertgrößen analysiert, die eine Größenverteilung von 800 bp bis zu 4.5 kB zeigten, die durchschnittliche Länge der cDNA-Inserts betrug für die humane Bank ca. 1.2 kB.

Beispiel 2

Durchführung eines Reporterassays

[0075] Die erhaltene Sequenz von 9B5 kann dazu benutzt werden, Aufschlüsse über die Einordnung des Proteins in Signaltransduktionskaskaden zu gewinnen. Dazu wird das offene Leseraster des Gens in einen gängigen Expressionsvektor (z.B. pCMV-tag, Fa. Stratagene) kloniert. Dieses Konstrukt kann mit anderen Konstrukten zusammen in eukaryontische Zellen transfiziert werden (z.B. mit der Calciumphosphatmethode, siehe Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, New York, 1997). Dies können Reporterkonstrukte sein, z.B. ein Luciferasegen unter Kontrolle eines Minimalpromotors mit mehreren Bindungsstellen für z.B. den Transkriptionsfaktor NF-kappaB oder AP-1. Extrakte aus den Zellen können dann einer Messung im Luminometer (z.B. Fa. Bertold) unterzogen werden. Eine Erhöhung des Luciferasewertes deutet auf eine Beeinflussung des Signaltransduktionsweges hin, der in der Aktivierung eines bestimmten Transkriptionsfaktors mündet. Kombinationen mit Expressionskonstrukten für andere Gene (z.B. MAP-Kinasen) können Aufschlüsse über die genaue Position von 9B5 in Signalkaskaden geben. Diese Reporterassays können auch mit anderen Systemen durchgeführt werden, z.B. lacZ oder Chloramphenicoltransferase (CAT-assays), ohne dass das Prinzip des Assays beeinflusst wird.

[0076] In derselben Weise können auch vorgefertigte Kits (z.B. Mercury in vivo kinase assay kits, Fa. Clontech) benutzt werden. Dabei wird der Tet-Repressor in Fusion mit der Transaktivator-domäne eines Phosphorylierungstargets (Transkriptionsfaktoren, z.B. Jun) exprimiert. Die Aktivierung eines Luciferasekonstruktes unter Kontrolle eines Tet-Repressor-Elements findet nur statt, wenn eine spezifische Phosphorylierung der Transaktivator-domäne durch eine Kinase (z.B. 9B5) erfolgt. Auf diese Weise ist die Einordnung in einen zellulären Signaltransduktionsweg möglich.

Beispiel 3

Kinase-Assays

[0077] Protein-Kinasen sind biochemisch sehr gut charakterisiert. Die Kinase-Aktivität von 9B5 kann nachgewiesen

werden, indem das offene Leseraster von 9B5 in einen Expressionsvektor mit einem Epitop-Tag kloniert wird (z.B. pcDNA-myc-his), und in eukaryontische Zellen transfiziert wird (z.B. Cos-Zellen). Nach 48 h können Extrakte aus diesen Zellen gewonnen werden und eine Immunpräzipitation mit einem myc-spezifischen Antikörper und ProteinA-Beads durchgeführt werden. In einem Kinasepuffer in Anwesenheit von γ - ^{32}P -ATP wird eine Kinase-Reaktion durchgeführt. Die Proteine werden daraufhin denaturiert und auf einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Danach wird eine Autoradiographie durchgeführt. Markierte Banden geben Hinweise auf die Kinase-Aktivität von 9B5. Häufig findet sich auch eine Auto-phosphorylierung der Kinase selbst. Hinweise auf mögliche Phosphorylierungstargets geben auch Kotransfektionen mit potentiellen Targets, z.B. verschiedenen MAP-Kinasen, die ebenfalls mit einem Tag versehen werden und immunpräzipitiert werden können.

[0078] Kinase-Assays können auch mit 9B5 durchgeführt werden, das in vitro transkribiert /translatiert wurde (z.B. T7-Reticulozytensystem der Fa. Promega). Ebenfalls kann Protein benutzt werden, das in E.coli exprimiert wurde, z.B. als GST-Fusionsprotein oder als HIS-getagtes Konstrukt. Die Tags können dabei zur Aufreinigung des Proteins benutzt werden. Die gereinigten Proteine können dann in Kinasepuffer mit potentiellen Substraten inkubiert werden. Häufig wird hier MBP (myelin basic protein) verwendet, das häufig von Ser-Thr-Kinasen unspezifisch phosphoryliert wird.

[0079] Die Kinasedomäne von Protein-Kinasen ist sehr gut definiert. Häufig genügt die Mutation einzelner Aminosäuren in der Phosphatübertragungsdomäne für den Funktionsverlust des Proteins (z. B. K709M bei ASK1 (Chang, et al., Science, 281, 1860-3, (1998)); K90A in DRAK 1, K62A in DRAK2 (Sanjo, et al., J Biol Chem, 273, 29066-71, (1998)); KK429-430AA in NIK (Sanjo, et al., J Biol Chem, 273, 29066-71, (1998)); K63W in TAK1 (Ninomiya-Tsuji, et al., Nature, 398, 252-6, (1999)). Diese inaktiven Kinasen sind oft als dominant-negative Inhibitoren für die Evaluation des zellulären Pathways von grosser Bedeutung, z.B. in Kotransfektionsexperimenten und Kinaseassays (Ninomiya-Tsuji, et al., Nature, 398, 252-6, (1999)). Eine solche Mutation lässt sich auch bei 9B5 durchführen.

[0080] Die spezifische Phosphorylierung von Zielprotein lässt sich auch mit Phosphorylierungsspezifischen Antikörpern nachweisen, z.B. Phospho-SerThr/Tyr monoclonal antibody, mouse IgG2b, Fa. Clontech.

[0081] Weitere Beispiele für Kinaseassays, die in der Fachwelt gängig sind, sind z.B. dem Buch Protein Phosphorylation, A practical approach, ed. D.G.Hardie, 2nd ed., Oxford, 1999 zu entnehmen, insbesondere den Kapiteln 9 und 10.

Beispiel 4

Identifikation des Phosphorylierungstargets von 9B5

[0082] Die Identifikation von Phosphorylierungstargets von 9B5 kann zum Beispiel über Interaktionsscreening verlaufen. Dabei können zum einen eher klassische Peptidexpressionsbanken im Bakteriophagen lambda (das meistbenutzte System ist der Vektor lambda-gt11, siehe Ausubel et al., Current protocols in molecular biology, New York, 1997) benutzt werden. Ein Ansatz ist die Klonierung von 9B5 in einen bakteriellen Expressionsvektor unter Einbeziehung eines Aufreinigungstags (z.B. poly-Histidin oder GST) und einer Konsensusphosphorylierungsstelle für Protein-Kinase A (Sequenz RRASV). 9B5 kann damit in Bakterien nach Standardverfahren exprimiert und aufgereinigt werden. Damit kann 9B5 als Fänger mit ^{33}P oder ^{32}P durch Inkubation mit Protein-KinaseA markiert werden. Die Expressionsbank kann dann mit dem markierten 9B5 inkubiert werden. Nach Exposition auf Autoradiogramme können positive Klone identifiziert werden und nach Standardverfahren isoliert und sequenziert werden. Dieses Verfahren kann auch auf folgende Weise abgewandelt werden: Die Autophosphorylierungseigenschaft von 9B5 kann ausgenutzt werden, um 9B5 mit ^{33}P - γ ATP über einfache Inkubation zu markieren. Das Verfahren kann auch so modifiziert werden, dass die Expressionsbank mit aufgereinigtem 9B5 und ^{33}P - γ ATP unter Phosphorylierungsbedingungen (Phosphorylierungspuffer etc.) inkubiert wird, und exprimierte Peptide aktiv von 9B5 markiert werden. Dieses Verfahren ist allerdings instabiler als das oben beschriebene. Sequenzierte Peptide können zur Erstellung einer Konsensuserkennungs- und -phosphorylierungssequenz benutzt werden. Dies ermöglicht die Auffindung potentieller Substrate über bioinformatische Methoden. Kandidaten können durch Expression und Inkubation mit 9B5 verifiziert werden. Beispiele für erfolgreiche Durchführung dieser Formen des Expressionsscreenings finden sich in (Mochly-Rosen and Gordon, FASEB J, 12, 35-42, (1998), Blonar and Rutter, Science, 256, 1014-8, (1992), Chapline, et al., J Biol Chem, 268, 6858-61, (1993), Chapline, et al., J Biol Chem, 271, 6417-22, (1996), Kaelin, et al., Cell, 70, 351-64, (1992), Songyang, et al., Curr Biol, 4, 973-82, (1994)).

[0083] Das Phosphorylierungstarget von 9B5 lässt sich auch in einem yeast-two-hybrid screen (Fields and Song, Nature, 340, 245-6, (1989)) auffinden. So wurde z.B. die Interaktion von Ras und c-Raf (einer Ser-Thr-Kinase) in einem y2h-System entdeckt (Fields and Song, Nature, 340, 245-6, (1989)). Ebenso ist die Interaktion der Ser-Thr-Kinase SNF1 mit SNF4 geradezu ein Prototyp für das y2h-System (Fields and Song, Nature, 340, 245-6, (1989)). Im Prinzip äquivalent zu den Hefescreens können auch Säugetiersysteme verwendet werden (Fields and Song, Nature, 340, 245-6, (1989)). Für einen y2h-screen wird das offene Leseraster von 9B5 in einen sog. "bait-Vektor" mit der GAL4-Bindungsdomäne kloniert (z.B. pGBT10, Fa. Clontech). Damit kann eine sogenannte "prey-library" in einem Hefestamm nach mehreren gängigen Protokollen auf interagierende Proteine durchsucht werden. Dabei kann es oft nützlich sein, kinase-negative Mutanten einzusetzen, da diese oft stabiler mit den Phosphorylierungstargets interagieren. Serin-Threonin-Kinasen in

EP 1 282 700 B1

einem Syntheseweg können durch Adaptermoleküle in räumliche Nähe gebracht werden, um spezifische Phosphorylierungen besser durchführen zu können (Chang, et al., Science, 281, 1860-3, (1998)), (Yasuda, et al., Mol Cell Biol, 19, 7245-54, (1999), Whitmarsh and Davis, Trends Biochem Sci, 23, 481-5, (1998), Whitmarsh, et al., Science, 281, 1671-4, (1998)) Es ist deshalb auch möglich, über zwei Schritte im yeast-two-hybrid System auf die Phosphorylierungstargets zu stossen, indem man zunächst ein Adapterprotein kloniert, und mit diesem als "bait" das spezifische Zielmolekül findet. Insgesamt können mit dem y2h-System auch Kartierungs-Experimente für Interaktionsdomänen durchgeführt werden.

[0084] Es ist ebenfalls möglich, Co-Immunpräzipitationen aus mit 9B5-Expressionsvektoren transfizierten Zellen zu benutzen, um daran bindende Proteine aufzureinigen, und über Proteinsequenzierungsmethoden (z.B. MALDI) die Gene zu identifizieren.

[0085] Ebenfalls möglich ist es, nach einer Immunpräzipitation mit anschliessendem Kinaseassay aus einem Zellextrakt die phosphorylierten Banden aufzureinigen, und diese zu sequenzieren.

[0086] Weitere Beispiele für die Identifikation von Protein-Kinase-Substraten, die in der Fachwelt gängig sind, sind z.B. dem Buch Protein Phosphorylation, A practical approach, ed. D.G.Hardie, 2nd ed., Oxford, 1999 zu entnehmen.

Beispiel 5

Apoptoseassays

[0087] Sehr viele bisher identifizierter Serin-Threonin-Kinasen sind an apoptotischen Prozessen beteiligt, z.B. ASK1 (Zhang, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8511-5, (1999)), (Ichijo, et al., Science, 275, 90-4, (1997)), DRAKs (Zhang, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8511-5, (1999)), (Ichijo, et al., Science, 275, 90-4, (1997)). Die Beteiligung von 9B5 an apoptotischen Kaskaden kann weiterhin untersucht werden, indem Expressionskonstrukte mit 9B5 in eukaryontische Zellen transfiziert werden, und danach die Induktion von Apoptose untersucht wird. Dies kann z.B. durch Anfärbung mit Annexin geschehen (Fa. Roche Diagnostics), durch Antikörper, die die aktive Form von Caspase-3 erkennen (Fa. New England Biolabs), oder durch ELISAs, die DNA-Histon-Bruchstücke erkennen (cell-death elisa, Roche Diagnostics). Diese Induktion von Apoptose kann zelltyp-spezifisch sein, deshalb müssen mehrere Zelllinien und primäre Zellen untersucht werden. Die Induktion von Apoptose kann ebenfalls stimulus-spezifisch sein, deshalb können mehrere Stresssituationen für die Beantwortung dieser Frage hilfreich sein, z.B. Hitzeschock, Hypoxiebedingungen, Cytokinbehandlungen (z.B. Il-1, Il-6, TNFalpha), H₂O₂-Behandlung. An Zelltypen kommen mehrere gebräuchliche Linien, z.B. Cos-Zellen, HEK-Zellen, PC12-Zellen, THP-1-Zellen und primäre Zellen wie z.B. Neurone, Astrozyten in Frage, ebenso wie andere immortalisierte und primäre Zelllinien nach Bedarf.

Beispiel 6

High-throughput screening assays zur Identifikation von Inhibitoren von 9B5

[0088] 9B5 kann eingesetzt werden, um Inhibitoren der Interaktion mit seinen Interaktionspartnern (z.B. Adaptormolekülen) zu finden. Dies läßt sich z.B. mit dem FRET-System (frequency resonance energy transfer) durchführen, indem 9B5 mit GFP (green fluorescent protein) und sein Interaktionspartner mit BFP (blue fluorescent protein) in Fusion exprimiert und aufgereinigt wird. In einem zellfreien System kann dann die Abnahme der Emission von BFP als Indikator für die Gegenwart eines Inhibitors benutzt werden beim Absuchen komplexer chemischer Banken.

[0089] Das Hauptziel bei der therapeutischen Ausnutzung der entdeckten Proteinkinase ist jedoch zunächst die Ausschaltung der Proteinkinasefunktion, da dies am einfachsten durchzuführen ist. Protein-Kinasen bieten sich prinzipiell für die Durchführung von High-Throughput-Assays zur Identifikation von Inhibitoren (small-molecule-inhibitors) der Kinaseeigenschaft des Proteins an, da sich die Enzymeigenschaft selbst leicht als Indikator verwenden lässt (siehe auch Beispiel 3, Kinaseassays).

[0090] Eine einfache Implementierung eines HTS-Systems für 9B5 läßt sich nach der Filterassaymethode von Reuter et al. (Reuter et al., Methods in Enzymology, 255: 245 (1995)) durchführen. Dabei benutzt man MBP als unspezifisches Substrat. Dieses wird auf 96-Loch-Platten, die sich für ELISA eignen (z.B. FlashPlates, NEN Life Science Products, oder NUNC) aufgebracht. Zugegeben wird Reaktionspuffer (3x Kinase Reaktions Puffer enthält: 60 mM HEPES (pH 7.5), 30 mM MgAc, 0.15 mM gammaATP, 3 mM DTT, 0.03 mM Na-Orthovanadat). 0.25 µCi 33P-Gamma-ATP und die beschriebene Kinase werden mit einer Konzentration von nicht mehr als 1 µg/ml zugesetzt (eine Titration sollte zunächst durchgeführt werden). In Gegenwart des potentiellen Inhibitors (z.B. small molecules aus einer chemischen Bank) (z.B. 10 µM) wird die Reaktion für 1 h bei 30° inkubiert. Das gesamte Reaktionsvolumen beträgt 100 µl. Die Reaktion wird durch Zugabe von EDTA (pH 7) bis zu einer Endkonzentration von 80 mM gestoppt. Die Proben werden dann zentrifugiert, und 50 µl des Überstandes auf ein p81 Kationenaustauscherpapier (Fa. Whatman) aufgebracht. Die Filter werden dann 3 mal gewaschen in 200 ml 180 mM Phosphorsäure (je 5 min), und einmal in 200 ml 96% Ethanol. Nach Lufttrocknen

wird die Radioaktivität der Filter durch Szintillationszählung bestimmt. Stoffe, die die Kinaseaktivität um $\geq 50\%$ reduzieren (bei $10 \mu\text{M}$) fallen durch eine $>50\%$ ige Reduktion der Inkorporation auf. Spezifität und Sensitivität der möglichen Inhibitoren werden durch Titration zur Bestimmung der IC_{50} , und durch Substitution anderer Kinasen im Assay bestimmt. Relative Vergleiche der Inhibitionswirkung auf andere Kinasen erlauben so ein Mass für die Spezifität.

Für die Durchführung von Screens auf Kinaseinhibitoren bieten sich auch modernere Systeme mit dem scintillation proximity assay (SPA) an (Fa. Amersham Life Science, MAP kinase SPA; (Zhang, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8511-5, (1999)), (Ichijo, et al., Science, 275, 90-4, (1997))). McDonald beschreibt einen Assayaufbau für die Raf/MEK/ERK Kaskade, die Inhibitoren der ganzen Kaskade identifizieren kann. Als Substrat wird hier ein biotinyliertes Peptid benutzt, das nach Phosphorylierung mit ^{33}P an Avidin-beschichtete SPA-beads binden kann. Die MAP-Kaskade wird hier in vitro rekonstituiert, mit den einzelnen Bestandteilen als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert oder im Falle von cRAF1 mit dem Baculovirussystem hergestellt. Das erste Element der Kaskade (MAP-KKK) muss hierbei ständig gleichmässig aktiviert sein, um verlässlich Inhibitoren screenen zu können. Dies wurde in diesem Fall durch Coexpression von src im Baculovirussystem erreicht. Dadurch wird eine ras-analoge Aktivierung von cRaf erreicht. Denkbar ist auch prinzipiell eine andere Art, eine MAP-Kinase durch Phosphorylierung zu aktivieren. Eine andere Möglichkeit der konstitutiven Aktivierung einer MAP-Kinase besteht in der Mutierung der zu phosphorylierenden Aminosäuren. Dies war im Falle von MEK1 z.B. möglich durch Austausch der Serine Ser218 und Ser222 durch Glutamat (Zhang, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8591-5, (1999)), (Ichijo, et al., Science, 275, 90-4, (1997)). Im Falle von 9B5 kann man zunächst einen Interaktionsscreen (z.B. y2h-System) durchführen, um ein Phosphorylierungstarget zu identifizieren, oder direkt MBP (myelin basic protein) als Substrat verwenden. Danach kann ein Peptid aus der Zielsequenz mit einem Biotinanker synthetisiert werden. Dieses kann an Avidingekoppelte SPA-beads der Fa. Amersham binden. In die Reaktion wird noch aufgereinigtes (z.B. bakteriell produziertes) 9B5-Protein zugegeben und gamma-32P-ATP. Dies kann im Microtitermasstab erfolgen. Unter Normalbedingungen wird das Ziel-Peptid phosphoryliert und eine Szintillationsantwort auslösen. Vor Zugabe des Ziel-Peptids wird man nun aus einer Bibliothek chemischer Substanzen solche mit der Reaktion vorinkubieren. Nach Zugabe des Ziel-Peptids kann dann die Szintillationsantwort gemessen werden. Ein Abfall der Antwort bedeutet die Gegenwart eines potentiellen Inhibitors. Die durchsuchte Bibliothek sollte möglichst komplex sein, und viele unterschiedliche Substanzklassen, enthalten. Beispiele für eine Substanzklasse spezifischer Inhibitoren für eine Proteinkinase (p38) finden sich beispielsweise in US Pat Nr. 5,945,418. Andere Substanzklassen die Proteinkinasen inhibieren können sind z.B. bis monocyclische, bicyclische oder heterocyclische Arylverbindungen (WO 92/20642), Vinylen-azaindol Derivate (WO 94/14808), 1-Cyclopropyl-4-pyridyl-quinolone (US-Patent No. 5,330,992), Styrylverbindungen (US Patent No. 5,217,999), styryl-substituierte Pyridyl-Verbindungen (US Patent No. 5,302,606), bestimmte Quinazolin-Derivate (EP-Anmeldung No 0 566 266 A1), Seleoindeole und Selenide (WO 94/03427), tricyclische polyhydroxyliche Verbindungen (WO 92/21660), und Benzylphosphonische Säuren (WO 91/15495).

[0091] Das Spezifische des Assays ist allein bestimmt durch die Identität der beschriebenen Ser-Thr-Kinase. Es können verschiedene Substrate benutzt werden. Diese können in verschiedenen Ausformungen des o.a. Assayprinzips eingesetzt werden. Dabei ist der wesentliche Punkt jedoch immer die Benutzung der Kinaseaktivität von 9B5 zu Screeningzwecken. Beispielsweise kann das Substrat in freier Lösung vorkommen, wie auch an eine Phase gekoppelt sein, wie oben angeführt. Das Substrat kann jedoch auch auf einer Zelloberfläche getragen werden, oder sogar intrazellulär angeboten werden. Dies hat keinen Einfluß auf das zugrundeliegende Assayprinzip

Beispiel 7

Herstellung von transgenen und knock-out Mäusen

[0092] Die Kenntnis der Sequenz von 9B5 kann dazu benutzt werden, genetisch veränderte Mäuse (oder andere Tiere) herzustellen. Dazu wird z.B. eine konstitutiv inaktive Mutante von 9B5 in transgenen Mäusen exprimiert, z.B. unter einem NSE-Promotor in Neuronen, unter einem MBP-Promotor in Oligodendrozyten etc. Dies sollte einen dominantnegativen Effekt haben, und so eine Inhibition von 9B5 imitieren. Dies kann wertvolle Hinweise auf mögliche pharmakologische Auswirkungen von Inhibitoren in vivo haben. Ebenso kann eine konstitutiv aktive Kinase exprimiert werden.

[0093] Ebenso kann die Herstellung von knock-out Tieren Hinweise auf die Auswirkungen von Inhibitoren haben. Die Herstellung dieser genetisch veränderten Mäuse oder anderer Tiere erfolgt nach Standardverfahren, die dem Fachmann bekannt sind.

[0094] Die genetisch veränderten Tiere können danach in unterschiedlichen Krankheitsmodellen untersucht werden (z.B. experimentell herbeigeführtem Schlaganfall, MCAO), oder Tumormodellen.

Beispiel 8

Proliferationsassays

5 **[0095]** Viele der bisher bekannten Serin-Threonin-Kinasen sind an neoplastischen Prozessen beteiligt. Die Beteiligung von 9B5 beim Wachstum von Zellen, dem Zellzyklus, der tumorigenen Transformation kann weiter untersucht werden, indem Expressionskonstrukte mit 9B5 in eukaryontische Zellen transfiziert werden, und danach die Induktion von Tumorigenizität untersucht wird, z.B. in einem Soft-Agar-Test (Zhang, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 8511-5, (1999)), (Ichijo, et al., Science, 275, 90-4, (1997)). An Zelltypen kommen mehrere gebräuchliche Linien, z.B. Cos-Zellen, HEK-Zellen, PC12-Zellen, THP-1-Zellen und primäre Zellen, wie z.B. Neurone, Astrozyten in Frage, ebenso wie andere
10 immortalisierte und primäre Zelllinien nach Bedarf.

SEQUENZPROTOKOLL

15 **[0096]**

<110> BASF-LYNX Bioscience

<120> Neuronale Serin-Threonin-Proteinkinase

20

<130> p31560

<140>

<141>

25

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

30

<210> 1

<211> 3170

<212> DNA

<213> Mus musculus

35

<220>

<221> polyA_signal

<222> (3094)..(3099)

<220>

40

<223> Kodierende Sequenz: (1)..(2172)

<400> 1

45

50

55

EP 1 282 700 B1

	aaagggccgt	cctgggtccag	ccgttccctg	ggtgcccggt	gccggaactc	tatcgcttcc	60
	tgccttgagg	aacaaccca	tgtgggcaac	tataggctgc	taaggaccat	cggaagggc	120
	aacttcgcca	aagtcaagct	ggctcggcat	atcctcacgg	gccgggaggt	cgctattaag	180
5	atcattgata	agaccagct	gaacccagt	agcttgacga	agctgttcag	agaagtccga	240
	attatgaagg	gactcaacca	cccacaatc	gtgaagcttt	ttgaggtgat	agagacggag	300
	aagacgctat	acctggtgat	ggaatacgt	agcgacagg	aagtgtttga	ctacctcgtg	360
	tcgcacggcc	gcatgaagga	gaaggaggct	cgagccaagt	tgccgcagat	cggtgcagcc	420
	gtgcaactact	gtcatcagaa	gaacattgta	cacagggatc	taaaggctga	aaacctgttg	480
10	ctggatgccg	aggccaacat	caaaatcgcc	gacttcggct	tcagcaatga	gttcacgctg	540
	ggctccaagc	tggacacctt	ctgtggggagc	ccccatacg	ccgccccaga	gctgttccag	600
	ggcaagaagt	atgatggggc	agaggtggac	atctggagcc	tgggtgtcat	cctgtacacg	660
	ctggtcagcg	gctccctgcc	cttcgatggg	cacaacctca	aggagctcgc	ggagcgaatc	720
	ctcagaggaa	agtaccgggt	ccccttctac	atgtctacag	actgcgagag	cattctgcgg	780
	agatttctgg	tgctgaaccc	cgcaaaacgc	tgtactctgg	agcaaatcat	gaaagacaaa	840
15	tggatcaaca	tcggctatga	gggtgaggag	ctgaagccat	acacggagcc	tgaggaggac	900
	ttcggggaca	ccaagagaat	tgaggtgatg	gtgggtatgg	gctacacacg	ggaagaaatc	960
	aaagaggcct	tgaccaacca	gaagtacaac	gaggtgaccg	ccacctacct	cctgctgggc	1020
	aggaagactg	atgaggggtg	ggaccggggt	gccccagggc	tggccctggc	acgggtgcgg	1080
	gccccagcg	acaccacca	cgggacaagc	tccagcaaag	gcagcagcca	caacaaagg	1140
20	caacgggctt	cttctctcac	ctaccaccgc	cagcgccgtc	acagtgactt	ctgtggcccc	1200
	tcccctgccc	cgctgcaccc	gaagcgcacg	ccaaccagca	cgggagacac	ggagctcaaa	1260
	gaagagcgga	tgccgggtcg	gaaagcgagc	tgagtgagc	tgggcagtgg	aagtcgaggc	1320
	ttgccccctt	ccagccccat	ggtcagcagt	gccacaacc	ccaataaggc	agagatccct	1380
	gagcggcgga	aggacagcac	tagcaccctt	aacaacctcc	ccccagcat	gatgaccgga	1440
25	agaaacacct	atgtgtgcac	agagcgacca	ggatctgaac	gcccgtcctt	gttgccaaat	1500
	ggcaaagaaa	atagctccgg	tacctcgcg	gtgccccctg	cctcgccttc	cagtcatagc	1560
	ctggctcccc	cgtcaggcga	gcggagccgc	ctggctcggg	gctccaccat	ccgcagcacc	1620
	ttccatgggg	gccaggtccg	agaccggcgg	gcagggagcg	ggagtggcgg	gggtgtgcag	1680
	aatggacccc	cagcctcacc	cacgcttgcc	cacgaggccg	cacccctgcc	ctccgggcgg	1740
30	cctcgcccc	ccaccaacct	cttcaccaag	ctgacctcca	aactgaccgg	aagggtcaca	1800
	gacgaacctg	agagaatcgg	gggacctgag	gtcacaagtt	gccatctacc	ttgggataaa	1860
	acggaaccgg	ccccaggct	gctccgattc	ccctggagtg	tgaagctgac	cagctcgcga	1920
	cctcctgagg	ccctgatggc	tgccatgcga	caggccacag	cggccgcccg	ctgccgggtgc	1980
	cgccagccgc	agccgttctt	gctggcctgc	ctgcacgggg	gtgcccggcg	gccccagccc	2040
35							
	ctgtcccatt	tcgaagtgga	ggtgtgccag	ctgccccggc	ccggcctcag	gggcgtcctc	2100
	ttccgccgtg	tggcgggcac	cgccctggcc	ttccgcaccc	tcgtcaccgg	catctccaac	2160
	gacctcgaac	tctgagccac	cgccaccact	accaccgcca	cagccaccat	cacagcccgg	2220
40	gtcccttctt	tctctggttc	ctttcacttc	cccaagaggg	gaagaggaca	gaggagaggg	2280
	tgccctgtgt	catgactgaa	gtttccctgg	attagattgg	tggacagaga	cagtgtgggg	2340
	acacatgaca	tgataagagg	gctcagcagg	gggagctggc	accctcctag	ggcctctggt	2400
	gggaccccc	tccccacaat	cttgtttctc	tgcaaggcac	ctgaggagac	tttggggaca	2460
	ggagtgagaa	gggaaactga	ggaaattctc	ccattcaggg	agagctgcca	ggattaatga	2520
45	ctggagacag	acttgggggg	ttcagggagt	tgggggagtc	acagacagaa	accttcccct	2580
	cactccccct	tatgatcgaa	cctccttcat	gccccaggct	ggcgcggggc	actttgtaca	2640
	aatccgtgta	tatactcctg	tccctctgca	gaggtctctc	ggggagctgc	tgctgccgcc	2700
	tccgattttt	aagttattgc	cccgcctctt	ctgtcagctc	ctcatctgca	gcctgttact	2760
	caataaacag	taggatccc	tccaaccccg	acctcctccc	tggccgacct	ggggtttccc	2820
50	ttctcagccc	ttggcctgca	ggtgagccag	ggagctgggg	acttgacccc	aacctgtggt	2880
	tctgcttgct	gagcctttgt	tatctcatct	tcagaatggg	aacagtgggg	ttggaggatg	2940
	ggtcaaggat	gactatggaa	gagggcagaa	cagagctcag	cctcttccac	gaggccccag	3000
	ccttctgtga	caccctctc	ttggcactc	actcccctct	gccatattac	actggaccca	3060
	gagcctcttc	ctattccagt	aatacatgta	ttcaataaac	aatcaacgac	tggtgccgac	3120
55	tccacgctag	gcccagttct	ggacataaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa		3170

<210> 2

<211> 3250

EP 1 282 700 B1

<212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> polyA__signal
 <222> (3174)..(3179)

<220>
 <223> Kodierende Sequenz: (1)..(1980)

<400> 2

15
 20
 25
 30
 35
 40

```

aaagggccgt cctggtccag cgttccctg ggtgcccggt gccggaactc tctcgcttcc 60
tgccctgagg aacaacccca tgtgggcaac tataggctgc taaggaccat cgggaagggc 120
aacttcgcca aagtcaagct ggctcggcat atcctcacgg gccgggaggt cgctattaag 180
atcattgata agaccagct gaaccccagt agcttgcaga agctgttcag agaagtccga 240
attatgaagg gactcaacca cccaacatc gtgaagcttt ttgaggtgat agagacggag 300
aagacgctat acctggtgat ggaatacgt agcgcaggag aagtgttga ctacctcgtg 360
tcgcacggcc gcatgaagga gaaggaggct cgagccaagt tgcggcagat cgtgtcagcc 420
gtgcactact gtcatacaga gaacattgta cacagggatc taaaggctga aaacctgttg 480
ctggatgccg aggccaacat caaaatcgcc gacttcggct tcagcaatga gttcacgctg 540
ggctccaagc tggacacctt ctgtgggagc cccccatagc ccgcccaga gctgttccag 600
ggcaagaagt atgatgggccc agaggtggac atctggagcc tgggtgtcat cctgtacacg 660
ctggtcagcg gctccctgcc ctctcgatgg cacaacctca aggagctgcg ggagcgaatc 720
ctcagaggaag agtaccgggt ccccttctac atgtctacag actgcgagag cattctgctg 780
agatttctgg tgctgaaccc cgcaaacgc tgtactctgg agcaaatcat gaaagacaaa 840
tggatcaaca tcggctatga gggtagggag ctgaagccat acacggagcc tgaggaggac 900
ttcgggggaca ccaagagaat tgaggtgatg gtgggtatgg gctacacacg ggaagaaatc 960
aaagaggcct tgaccaacca gaagtacaac gaggtgaccg ccacctacct cctgctgggc 1020
aggaagactg atgaggggtg ggaccggggt gccccagggc tggccctggc acgggtgctg 1080
gcgcccagcg acaccaccaa cgggacaagc tccagcaaag gcagcagcca caacaaggg 1140
caacgggctt ctctctccac ctaccaccgc cagcgcctgc acagtgactt ctgtggcccg 1200
tcccctgccc cgctgcaccc gaagcgcagc ccaaccagca cgggagacac ggagctcaaa 1260
gaagagcgga tgccgggtcg gaaagcgagc tgcagtgcag tgggcagtgg aagtcgagge 1320
ttgccccctt ccagccccat ggtcagcagt gcccacaacc ccaataaggc agagatccct 1380
gagcggcgga aggacagcac tagcaccctt aacaacctcc ccccagcat gatgaccga 1440
agaaacacct atgtgtgcac agagcgacca ggatctgaac gccctcctt gttgcaaat 1500
ggcaaagaaa atagctccgg tacctcgcgg gtgccccctg cctcgccttc cagtcatagc 1560
ctggctcccc cgtcaggcga gcggagccgc ctggctcggg gctccaccat ccgagcacc 1620
ttccatgggg gccaggtccg agaccggcgg gcagggagcg ggagtggcgg ggggtgtgcag 1680
aatggacccc cagcctcacc cacgcttgc caccagggcc caccctgcc ctccgggcgg 1740
    
```

45

50

55

EP 1 282 700 B1

```

cctcgcccca ccaccaacct cttaccaag ctgacctcca aactgacctg aagggttacc 1800
ctcgatccct ctaaaccgca gaactctaac cgctgtgtct cgggcgcctc tctgccccag 1860
ggatccaaaa tcaggtcaca gacgaacctg agagaatcgg gggacctgag gtcacaagtt 1920
5 gccatctacc ttgggataaa acggaaaccg cccccaggct gctccgattc ccctggagtg 1980
tgaagctgac cagctcgcga cctcctgagg ccctgatggc tgccatgcga caggccacag 2040
cggccgcccc ctgccgggtg cgccagccgc agccgttccct gctggcctgc ctgacagggg 2100
gtgocggggg gcccagagccc ctgtcccatt tcaagtggg ggtgtgccag ctgccccggc 2160
ccggcctcag gggcgtcctc ttccgcccgtg tggcgggcac cgcctggcc ttccgcacc 2220
10 tcgtcaccgg catctccaac gacctcgaac tctgagccac cgcaccact accaccgcca 2280
cagccacat cacagcccgg gtccttctt tctctggttc ctttcacttc cccaagaggg 2340
gaagaggaca gaggagaggg tgccctgtgt catgactgaa gtttccctgg attagattgg 2400
tgacagaga cagtgtgggg acacatgaca tgataagagg gctcagcagg gggagctggc 2460
accctcctag ggcctctggt gggaccccc tccccacaat cttgttctc tgacgggcac 2520
15 ctgaggagac ttgggggaca ggagtgagaa ggaaactga ggaattctc ccattcaggg 2580
agagctgcca ggattaatga ctggagacag acttggggggg ttcaggaggg tgggggagtc 2640
acagacagaa accttcccct cactccccct tatgatcgaa cctccttcat gcccaggct 2700
ggcgcggggc actttgtaca aatccgtgta tatactcctg tccctctgca gaggtctctc 2760
ggggagctgc tgctgccgcc tccgattttt aagttattgc cccgccctt ctgtcagctc 2820
20 ctcatctgca gcctgttact caataaacag taggagtccc tccaaccccg acctcctccc 2880
tggccgacct ggggtttccc ttctcagccc ttggcctgca ggtgagccag ggagctgggg 2940
acttgacccc aacctgtggt tctgcttgtg gacccttgt tatctcatct tcagaatggg 3000
aacagtgggg ttggaggatg ggtcaaggat gactatggaa gagggcagaa cagagctcag 3060
cctcttccac gaggccccag ccttctgtga caccctcctc ttggccactc actccccctc 3120
25 gccatattac actggaccca gagcctcttc ctattccagt aatacatgta ttcaataaac 3180
aatcaacgac tgggtgccgac tccacgctag gccagttct ggacataaaa aaaaaaaaaa 3240
aaaaaaaaaa 3250

```

```

30 <210> 3
    <211> 3312
    <212> DNA
    <213> Homo sapiens

```

```

35 <220>
    <221> polyA_signal
    <222> (3275)..(3280)

```

```

40 <220>
    <223> Kodierende Sequenz: (64)..(2319)

```

```

<400> 3

```

45

50

55

EP 1 282 700 B1

aggggaccct gggacccccg cccccccac cgggccgccc ctgcccccg ggaccgag 60
 aagatgtctt cgcggacggt gctggccccg ggcaacgac ggaactcga cacgcatggc 120
 accttgggca gtggccgctc ctcggaacaa ggcccgtcct ggtccagccg ctactgggt 180
 5 gcccgttggc ggaactccat cgcctcctgt cccgaggagc agccccacgt gggcaactac 240
 cgctgtctga ggaccattgg gaagggcaac tttgccaaag tcaagctggc tcggcacatc 300
 ctactggtc gggaggttgc catcaagatt atcgacaaaa cccagctgaa tcccagcagc 360
 ctgcagaagc tgttccgaga agtccgcatc atgaagggcc taaaccacc caacatcgtg 420
 aagctctttg aggtgattga gactgagaag acgctgtacc tggatgagga gtacgcaagt 480
 10 gctggagaag tgtttgacta cctcgtgtcg catggccgca tgaaggagaa ggaagctcga 540
 gccaagttcc gacagattgt ttcggtgtg cactattgtc accagaaaaa tattgtacac 600
 agggacctga aggctgagaa cctcttgctg gatgccgagg ccaacatcaa gattgctgac 660
 tttggcttca gcaacgagtt cacgctggga tcgaagctgg acacgttctg cgggagcccc 720
 ccatatgccg ccccgagct gtttcagggc aagaagtagc acgggcccga ggtggacatc 780
 tggagcctgg gagtcatcct gtacaccctc gtcagcggct ccctgccctt cgacgggcac 840
 15 aacctcaag agctgcggga gcgagtact agagggaagt accgggtccc tttctacatg 900
 tcaacagag gtgagagcat cctgcggaga tttttggtgc tgaaccagc taaagctgt 960
 actctcgagc aaatcatgaa agacaaatgg atcaacatcg gctatgagg tgaggattg 1020
 aagccataca cagagcccga ggaggacttc ggggacacca agagaattga ggtgatggtg 1080
 ggtatgggct acacacggga agaaatcaaa gagtcttga ccagccagaa gtacaacgaa 1140
 20 gtgaccgcca cctacctcct gctgggcagg aagactgagg aggggtggga ccggggcgcc 1200
 ccagggtg cctggcacg ggtgcggcg cccagcgaca ccaccaacgg aacaagttcc 1260
 agcaaaggca ccagccacag caaaggcgag cggagttcct cttccaccta ccaccgacag 1320

25 cgcaggcata gcgatttctg tggcccatcc cctgcacccc tgcaccccaa acgcagcccg 1380
 acgagcacgg gggaggcggg gctgaaggag gagecggctg caggccggaa ggcgagctgc 1440
 agcaccgchg ggagtgggag tcgagggtcg cccccctcca gccccatggt cagcagcgcc 1500
 cacaacccca acaaggcaga gatcccagag cggcggaagg acagcacgag ccccccaac 1560
 30 aacctccctc tagcatgat gaccgcgaga aacacctacg tttgcacaga acgcccgggg 1620
 gctgagcgcc cgtcactgtt gccaaatggg aaagaaaaca gctcaggcac cccacgggtg 1680
 ccccctgct ccccctccag tcacagcctg gcacccccat caggggagcg gagccgctg 1740
 gcacgtggt ccacatccg cagcacctc catggtggcc aggtccggga ccggcgggca 1800
 gggggtggg gtggtgggg tgtgcagaat gggccccctg cctctcccac actggcccat 1860
 35 gaggtgcac ccctgcccgc cgggcggccc cgccccacca ccaacctctt caccaagctg 1920
 acctcaaac tgaccggaag ggtcgcagac gaacctgaga gaatcggggg acctgaggtc 1980
 acaagttgcc atctacctg ggatcaaacg gaaaccgccc cccggctgct ccgattcccc 2040
 tggagtgtga agctgaccag ctcgcgccct cctgagccc tgatggcagc tctgcgccag 2100
 gccacagcag ccgcccctg ccgctgcgc cagccacagc cgttctgct ggctgcctg 2160
 cacgggggtg cgggcgggccc cgagcccctg tcccacttcg aagtggaggt ctgccagctg 2220
 40 ccccgccag gcttgcgggg agttctcttc cgccgtgtgg cgggcaaccg cctggccttc 2280
 cgcacctcg tcacccgat ctccaacgac ctcgagctct gagccaccac ggtcccaggg 2340
 cccttactct tcctctccct tgtgccttc acttctacag gaggggaagg ggccaggag 2400
 gggattctcc ctttatcatc acctcagttt ccctgaatta tatttggggg caaagattgt 2460
 cccctctgct gttctctggg gccgctcagc acagaagaag gatgaggggg ctgagcgggg 2520
 45 ggagctggca ccttctgga gcctccagcc agtctgtcc tccctcgccc taccaagagg 2580
 gcacctgagg agactttggg gacagggcag gggcagggag ggaaactgag gaaatcttcc 2640
 attcctcca acagctcaaa attaggcctt gggcaggggc agggagagct gctgagccta 2700
 aagactggag aatctggggg actgggagtg ggggtcagag aggcagatc cttcccctcc 2760
 cgtcccctca cgtcaaac ccacttctt gcccagggt ggcgcggggc actttgtaca 2820
 50 aatccttgta aataccccac accctcccct ctgcaaagg ctcttgagga gctgccgctg 2880
 tcacctacgg tttttaagtt attacacccc gaccctcctc ctgtcagccc cctcacctgc 2940
 agcctgttgc ccaataaatt taggagagtc cccccctccc caatgctgac cctaggattt 3000
 tccttccctg ccctcacctg caaatgagtt aaagaagagg cgtgggaatc caggcagtg 3060
 ttttccctt cggagcctcg gttttctcat ctgcagaatg ggagcgttg gggtgggag 3120
 55 gtaaggatgg tcgtggaaga agcaggatg gaactcggcc tcatccccga ggccccagtt 3180
 cctatatcgg gccccatt catccactca cactcccagc caccatgtta cactygactc 3240
 taagccactt ctactccag tagtaaattt attcaataaa caatcattga cccatgccta 3300
 aaaaaaaaaa aa 3312

EP 1 282 700 B1

<210> 4
<211> 3392
<212> DNA
<213> Homo sapiens

5

<220>
<221> polyA_signal
<222> (3355)..(3360)

10

<220>
<223> Kodierende Sequenz: (64)...(2127)

<400> 4

15

```
aggggaccct gggacccccg cccccccac ccggccgcc ctgcccccg ggacccggag 60
aagatgtcct cgcggacggt gctggccccg ggcaacgac ggaactcgga cacgcatggc 120
accttgggca gtggccgctc ctcggacaaa ggcccgtcct ggtccagccg ctcaactggg 180
gcccgttgcc ggaactccat cgcctcctgt cccgaggagc agccccacgt gggcaactac 240
cgctgctga ggaccattgg gaagggaac ttgccaag tcaagctggc tcggcacatc 300
ctcaactggc gggaggttgc catcaagatt atcgacaaa cccagctgaa tcccagcagc 360
ctgcagaagc tgttccgaga agtccgcac atgaagggcc taaaccacc caacatcgtg 420
aagctctttg aggtgattga gactgagaag acgctgtacc tggatgatgga gtacgcaagt 480
gctggagaag tgtttgacta cctcgtgtcg catggccgca tgaaggagaa ggaagctcga 540
gccaaagtcc gacagattgt ttccgctgtg cactattgtc accagaaaaa tattgtacac 600
agggacctga aggctgagaa cctcttgctg gatgccgagg ccaacatcaa gattgctgac 660
tttggcttca gcaacgagtt cacgctggga tcgaagctgg acacgttctg cgggagcccc 720
ccatatgccg ccccgagct gtttcagggc aagaagtacg acgggccgga ggtggacatc 780
tgagcctgg gagtcatcct gtacaccctc gtcagcggct ccctgcctt cgacggggcac 840
```

30

35

40

45

50

55

EP 1 282 700 B1

aacctcaagg agctgcggga gcgagtactc agaggggaagt accgggtccc tttctacatg 900
 tcaacagact gtgagagcat cctgcggaga tttttggtgc tgaaccagc taaacgctgt 960
 actctcgagc aaatcatgaa agacaaatgg atcaacatcg gctatgaggg tgaggagtgtg 1020
 5 aagccataca cagagcccga ggaggacttc ggggacacca agagaattga ggtgatggtg 1080
 ggtatgggct acacacggga agaaatcaaa gagtccctga ccagccagaa gtacaacgaa 1140
 gtgaccgcca cctacctcct gctgggcagg aagactgagg aggggtgggga ccggggcgcc 1200
 ccagggctgg cctggcacg ggtgcgggcg cccagcgaca ccaccaacgg aacaagttcc 1260
 agcaaaggca ccagccacag caaagggcag cggagttcct ctccaccta ccaccgccag 1320
 10 cgagggcata gcgatttctg tggcccatcc cctgcacccc tgcaccccaa acgcagcccg 1380
 acgagcacgg gggaggcggg gctgaaggag gagcggtgc caggccggaa ggcgagctgc 1440
 agcaccgchg ggagtgggag tgcagggtc cccccctcca gccccatggt cagcagcgcc 1500
 cacaacccca acaaggcaga gatcccagag cggcggaagg acagcacgag ccccccaac 1560
 aacctccctc ctagcatgat gaccgcgaga aacacctacg tttgcacaga acgcccgggg 1620
 15 gctgagcgcc cgtcactgtt gccaaatggg aaagaaaaca gctcaggcac cccacgggtg 1680
 ccccctgcct ccccctccag tcacagcctg gcacccccat caggggagcg gagccgcctg 1740
 gcacgtgggt ccaccatccg cagcaccttc catggtggcc aggtccggga ccggcgggca 1800
 gggggtgggg gtggtggggg tgtgcagaat gggccccctg cctctcccac actggcccat 1860
 gaggtgcac ccctgcccgc cgggcggccc cgccccacca ccaacctctt caccaagctg 1920
 20 acctccaaac tgacccgaag ggttaccctc gatecctcta aacggcagaa ctctaaccgc 1980
 tgtgtttcgg ggcctctct gccccaggga tccaagatca ggtcgcagac gaacctgaga 2040
 gaatcggggg acctgaggtc acaagttgcc atctaccttg ggatcaaacg gaaaccgcc 2100
 cccggtgct ccgattcccc tggagtgtga agctgaccag ctcgcgccct cctgaggccc 2160
 tgatggcagc tctgcgccag gccacagcag ccgcccgctg ccgctgccgc cagccacagc 2220
 25 agttcctgct ggctgcctg cacgggggtg cgggcgggccc cgagcccctg tcccacttcg 2280
 aagtggaggt ctgccagctg ccccggccag gcttgcgggg agttctcttc cgccgtgtgt 2340
 cgggcaccgc cctggccttc cgcaccctcg tcaccgcgat ctccaacgac ctcgagctct 2400
 gagccaccac ggtcccaggg cccttactct tcctctccct tgtcgcttc acttctacag 2460
 gaggggaagg ggccagggag gggattctcc ctttatcctc acctcagttt cctgaatta 2520
 30 tatttggggg caaagattgt cccctctgct gttctctggg gccgctcagc acagaagaag 2580
 gatgaggggg ctcagcgggg ggagctggca ccttctgga gcctccagcc agtcctgtcc 2640
 tcctcgccc taccaagagg gcacctgagg agactttggg gacagggcag gggcagggag 2700
 ggaaactgag gaaatcttcc attcctcca acagctcaa attaggcctt gggcaggggc 2760
 agggagagct gctgagccta aagactggag aatctggggg actgggagtg ggggtcagag 2820
 35 aggcagatc cttcccctcc cgtcccctca cgctcaaacc cccacttctt gccccaggct 2880
 ggcgcggggc actttgtaca aatccttgta aatacccac accctcccct ctgcaaagg 2940
 ctcttgagga gctgcccctg tcacctacgg tttttaagtt attacacccc gaccctctc 3000
 ctgtcagccc cctcacctgc agcctgttgc ccaataaatt taggagagtc cccccctcc 3060
 caatgctgac cctaggattt tccttccctg ccctcacctg caaatgagtt aaagaagagg 3120
 40 cgtgggaatc caggcagtggt tttttcctt cggagcctcg gttttctcat ctgcagaatg 3180
 ggagcgggtg ggggtgggaag gtaaggatgg tcgtggaaga aggcaggatg gaactcggcc 3240
 tcatccccga ggccccagtt cctatatcgg gccccccatt catccactca cactcccagc 3300
 cacctatgta cactggactc taagccactt ctactccag tagtaaat 3360
 caatcattga cccatgccta aaaaaaaaa aa 3392

45 <210> 5
 <211> 724
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50 <400> 5

55

EP 1 282 700 B1

Lys Gly Pro Ser Trp Ser Ser Arg Ser Leu Gly Ala Arg Cys Arg Asn
1 5 10 15
5 Ser Ile Ala Ser Cys Pro Glu Glu Gln Pro His Val Gly Asn Tyr Arg
20 25 30
Leu Leu Arg Thr Ile Gly Lys Gly Asn Phe Ala Lys Val Lys Leu Ala
35 40 45
10 Arg His Ile Leu Thr Gly Arg Glu Val Ala Ile Lys Ile Ile Asp Lys
50 55 60

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 282 700 B1

Thr Gln Leu Asn Pro Ser Ser Leu Gln Lys Leu Phe Arg Glu Val Arg
 65 70 75 80
 5 Ile Met Lys Gly Leu Asn His Pro Asn Ile Val Lys Leu Phe Glu Val
 85 90 95
 Ile Glu Thr Glu Lys Thr Leu Tyr Leu Val Met Glu Tyr Ala Ser Ala
 100 105 110
 10 Gly Glu Val Phe Asp Tyr Leu Val Ser His Gly Arg Met Lys Glu Lys
 115 120 125
 Glu Ala Arg Ala Lys Leu Arg Gln Ile Val Ser Ala Val His Tyr Cys
 130 135 140
 15 His Gln Lys Asn Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ala Glu Asn Leu Leu
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Glu Ala Asn Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Phe Ser Asn
 165 170 175
 20 Glu Phe Thr Leu Gly Ser Lys Leu Asp Thr Phe Cys Gly Ser Pro Pro
 180 185 190
 Tyr Ala Ala Pro Glu Leu Phe Gln Gly Lys Lys Tyr Asp Gly Pro Glu
 195 200 205
 25 Val Asp Ile Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Thr Leu Val Ser Gly
 210 215 220
 Ser Leu Pro Phe Asp Gly His Asn Leu Lys Glu Leu Arg Glu Arg Ile
 225 230 235 240
 30 Leu Arg Gly Lys Tyr Arg Val Pro Phe Tyr Met Ser Thr Asp Cys Glu
 245 250 255
 Ser Ile Leu Arg Arg Phe Leu Val Leu Asn Pro Ala Lys Arg Cys Thr
 260 265 270
 35 Leu Glu Gln Ile Met Lys Asp Lys Trp Ile Asn Ile Gly Tyr Glu Gly
 275 280 285
 Glu Glu Leu Lys Pro Tyr Thr Glu Pro Glu Glu Asp Phe Gly Asp Thr
 290 295 300
 40 Lys Arg Ile Glu Val Met Val Gly Met Gly Tyr Thr Arg Glu Glu Ile
 305 310 315 320
 Lys Glu Ala Leu Thr Asn Gln Lys Tyr Asn Glu Val Thr Ala Thr Tyr
 325 330 335
 45 Leu Leu Leu Gly Arg Lys Thr Asp Glu Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro
 340 345 350
 Gly Leu Ala Leu Ala Arg Val Arg Ala Pro Ser Asp Thr Thr Asn Gly
 355 360 365
 50 Thr Ser Ser Ser Lys Gly Ser Ser His Asn Lys Gly Gln Arg Ala Ser
 370 375 380
 55 Ser Ser Thr Tyr His Arg Gln Arg Arg His Ser Asp Phe Cys Gly Pro
 385 390 395 400

EP 1 282 700 B1

Ser Pro Ala Pro Leu His Pro Lys Arg Thr Pro Thr Ser Thr Gly Asp
 405 410 415
 5 Thr Glu Leu Lys Glu Glu Arg Met Pro Gly Arg Lys Ala Ser Cys Ser
 420 425 430
 Ala Val Gly Ser Gly Ser Arg Gly Leu Pro Pro Ser Ser Pro Met Val
 435 440 445
 10 Ser Ser Ala His Asn Pro Asn Lys Ala Glu Ile Pro Glu Arg Arg Lys
 450 455 460
 Asp Ser Thr Ser Thr Pro Asn Asn Leu Pro Pro Ser Met Met Thr Arg
 465 470 475 480
 15 Arg Asn Thr Tyr Val Cys Thr Glu Arg Pro Gly Ser Glu Arg Pro Ser
 485 490 495
 Leu Leu Pro Asn Gly Lys Glu Asn Ser Ser Gly Thr Ser Arg Val Pro
 500 505 510
 20 Pro Ala Ser Pro Ser Ser His Ser Leu Ala Pro Pro Ser Gly Glu Arg
 515 520 525
 Ser Arg Leu Ala Arg Gly Ser Thr Ile Arg Ser Thr Phe His Gly Gly
 530 535 540
 25 Gln Val Arg Asp Arg Arg Ala Gly Ser Gly Ser Gly Gly Val Gln
 545 550 555 560
 Asn Gly Pro Pro Ala Ser Pro Thr Leu Ala His Glu Ala Ala Pro Leu
 565 570 575
 30 Pro Ser Gly Arg Pro Arg Pro Thr Thr Asn Leu Phe Thr Lys Leu Thr
 580 585 590
 Ser Lys Leu Thr Arg Arg Val Thr Asp Glu Pro Glu Arg Ile Gly Gly
 595 600 605
 35 Pro Glu Val Thr Ser Cys His Leu Pro Trp Asp Lys Thr Glu Thr Ala
 610 615 620
 Pro Arg Leu Leu Arg Phe Pro Trp Ser Val Lys Leu Thr Ser Ser Arg
 625 630 635 640
 Pro Pro Glu Ala Leu Met Ala Ala Met Arg Gln Ala Thr Ala Ala Ala
 645 650 655
 40 Arg Cys Arg Cys Arg Gln Pro Gln Pro Phe Leu Leu Ala Cys Leu His
 660 665 670
 Gly Gly Ala Gly Gly Pro Glu Pro Leu Ser His Phe Glu Val Glu Val
 675 680 685
 45 Cys Gln Leu Pro Arg Pro Gly Leu Arg Gly Val Leu Phe Arg Arg Val
 690 695 700
 Ala Gly Thr Ala Leu Ala Phe Arg Thr Leu Val Thr Arg Ile Ser Asn
 705 710 715 720
 55 Asp Leu Glu Leu

EP 1 282 700 B1

<210> 6
<211> 660
<212> PRT
<213> Mus musculus

5

<400> 6

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 282 700 B1

Lys Gly Pro Ser Trp Ser Ser Arg Ser Leu Gly Ala Arg Cys Arg Asn
 1 5 10 15
 5 Ser Ile Ala Ser Cys Pro Glu Glu Gln Pro His Val Gly Asn Tyr Arg
 20 25 30
 Leu Leu Arg Thr Ile Gly Lys Gly Asn Phe Ala Lys Val Lys Leu Ala
 35 40 45
 10 Arg His Ile Leu Thr Gly Arg Glu Val Ala Ile Lys Ile Ile Asp Lys
 50 55 60
 Thr Gln Leu Asn Pro Ser Ser Leu Gln Lys Leu Phe Arg Glu Val Arg
 65 70 75 80
 15 Ile Met Lys Gly Leu Asn His Pro Asn Ile Val Lys Leu Phe Glu Val
 85 90 95
 Ile Glu Thr Glu Lys Thr Leu Tyr Leu Val Met Glu Tyr Ala Ser Ala
 100 105 110
 20 Gly Glu Val Phe Asp Tyr Leu Val Ser His Gly Arg Met Lys Glu Lys
 115 120 125
 25 Glu Ala Arg Ala Lys Leu Arg Gln Ile Val Ser Ala Val His Tyr Cys
 130 135 140
 His Gln Lys Asn Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ala Glu Asn Leu Leu
 145 150 155 160
 30 Leu Asp Ala Glu Ala Asn Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Phe Ser Asn
 165 170 175
 Glu Phe Thr Leu Gly Ser Lys Leu Asp Thr Phe Cys Gly Ser Pro Pro
 180 185 190
 35 Tyr Ala Ala Pro Glu Leu Phe Gln Gly Lys Lys Tyr Asp Gly Pro Glu
 195 200 205
 Val Asp Ile Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Thr Leu Val Ser Gly
 210 215 220
 Ser Leu Pro Phe Asp Gly His Asn Leu Lys Glu Leu Arg Glu Arg Ile
 225 230 235 240
 45 Leu Arg Gly Lys Tyr Arg Val Pro Phe Tyr Met Ser Thr Asp Cys Glu
 245 250 255
 Ser Ile Leu Arg Arg Phe Leu Val Leu Asn Pro Ala Lys Arg Cys Thr
 260 265 270
 50 Leu Glu Gln Ile Met Lys Asp Lys Trp Ile Asn Ile Gly Tyr Glu Gly
 275 280 285
 55

EP 1 282 700 B1

Glu Glu Leu Lys Pro Tyr Thr Glu Pro Glu Glu Asp Phe Gly Asp Thr
 290 295 300
 5 Lys Arg Ile Glu Val Met Val Gly Met Gly Tyr Thr Arg Glu Glu Ile
 305 310 315 320
 Lys Glu Ala Leu Thr Asn Gln Lys Tyr Asn Glu Val Thr Ala Thr Tyr
 325 330 335
 10 Leu Leu Leu Gly Arg Lys Thr Asp Glu Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro
 340 345 350
 Gly Leu Ala Leu Ala Arg Val Arg Ala Pro Ser Asp Thr Thr Asn Gly
 355 360 365
 15 Thr Ser Ser Ser Lys Gly Ser Ser His Asn Lys Gly Gln Arg Ala Ser
 370 375 380
 Ser Ser Thr Tyr His Arg Gln Arg Arg His Ser Asp Phe Cys Gly Pro
 385 390 395 400
 20 Ser Pro Ala Pro Leu His Pro Lys Arg Ser Pro Thr Ser Thr Gly Asp
 405 410 415
 Thr Glu Leu Lys Glu Glu Arg Met Pro Gly Arg Lys Ala Ser Cys Ser
 420 425 430
 25 Ala Val Gly Ser Gly Ser Arg Gly Leu Pro Pro Ser Ser Pro Met Val
 435 440 445
 Ser Ser Ala His Asn Pro Asn Lys Ala Glu Ile Pro Glu Arg Arg Lys
 450 455 460
 30 Asp Ser Thr Ser Thr Pro Asn Asn Leu Pro Pro Ser Met Met Thr Arg
 465 470 475 480
 Arg Asn Thr Tyr Val Cys Thr Glu Arg Pro Gly Ser Glu Arg Pro Ser
 485 490 495
 35 Leu Leu Pro Asn Gly Lys Glu Asn Ser Ser Gly Thr Ser Arg Val Pro
 500 505 510
 Pro Ala Ser Pro Ser Ser His Ser Leu Ala Pro Pro Ser Gly Glu Arg
 515 520 525
 Ser Arg Leu Ala Arg Gly Ser Thr Ile Arg Ser Thr Phe His Gly Gly
 530 535 540
 40 Gln Val Arg Asp Arg Arg Ala Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Val Gln
 545 550 555 560
 Asn Gly Pro Pro Ala Ser Pro Thr Leu Ala His Glu Ala Ala Pro Leu
 565 570 575
 45 Pro Ser Gly Arg Pro Arg Pro Thr Thr Asn Leu Phe Thr Lys Leu Thr
 580 585 590
 Ser Lys Leu Thr Arg Arg Val Thr Leu Asp Pro Ser Lys Arg Gln Asn
 595 600 605
 55 Ser Asn Arg Cys Val Ser Gly Ala Ser Leu Pro Gln Gly Ser Lys Ile

EP 1 282 700 B1

Met Ser Ser Arg Thr Val Leu Ala Pro Gly Asn Asp Arg Asn Ser Asp
1 5 10 15

5 Thr His Gly Thr Leu Gly Ser Gly Arg Ser Ser Asp Lys Gly Pro Ser
20 25 30

Trp Ser Ser Arg Ser Leu Gly Ala Arg Cys Arg Asn Ser Ile Ala Ser
35 40 45

10 Cys Pro Glu Glu Gln Pro His Val Gly Asn Tyr Arg Leu Leu Arg Thr
50 55 60

Ile Gly Lys Gly Asn Phe Ala Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ile Leu
65 70 75 80

15 Thr Gly Arg Glu Val Ala Ile Lys Ile Ile Asp Lys Thr Gln Leu Asn
85 90 95

Pro Ser Ser Leu Gln Lys Leu Phe Arg Glu Val Arg Ile Met Lys Gly
100 105 110

20 Leu Asn His Pro Asn Ile Val Lys Leu Phe Glu Val Ile Glu Thr Glu
115 120 125

25 Lys Thr Leu Tyr Leu Val Met Glu Tyr Ala Ser Ala Gly Glu Val Phe
130 135 140

Asp Tyr Leu Val Ser His Gly Arg Met Lys Glu Lys Glu Ala Arg Ala
145 150 155 160

30 Lys Phe Arg Gln Ile Val Ser Ala Val His Tyr Cys His Gln Lys Asn
165 170 175

Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ala Glu Asn Leu Leu Leu Asp Ala Glu
180 185 190

35 Ala Asn Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Phe Ser Asn Glu Phe Thr Leu
195 200 205

Gly Ser Lys Leu Asp Thr Phe Cys Gly Ser Pro Pro Tyr Ala Ala Pro
210 215 220

40 Glu Leu Phe Gln Gly Lys Lys Tyr Asp Gly Pro Glu Val Asp Ile Trp
225 230 235 240

45

50

55

EP 1 282 700 B1

Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Thr Leu Val Ser Gly Ser Leu Pro Phe
 245 250 255
 5 Asp Gly His Asn Leu Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Leu Arg Gly Lys
 260 265 270
 Tyr Arg Val Pro Phe Tyr Met Ser Thr Asp Cys Glu Ser Ile Leu Arg
 275 280 285
 10 Arg Phe Leu Val Leu Asn Pro Ala Lys Arg Cys Thr Leu Glu Gln Ile
 290 295 300
 Met Lys Asp Lys Trp Ile Asn Ile Gly Tyr Glu Gly Glu Glu Leu Lys
 305 310 315 320
 15 Pro Tyr Thr Glu Pro Glu Glu Asp Phe Gly Asp Thr Lys Arg Ile Glu
 325 330 335
 Val Met Val Gly Met Gly Tyr Thr Arg Glu Glu Ile Lys Glu Ser Leu
 340 345 350
 20 Thr Ser Gln Lys Tyr Asn Glu Val Thr Ala Thr Tyr Leu Leu Leu Gly
 355 360 365
 Arg Lys Thr Glu Glu Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Gly Leu Ala Leu
 370 375 380
 25 Ala Arg Val Arg Ala Pro Ser Asp Thr Thr Asn Gly Thr Ser Ser Ser
 385 390 395 400
 Lys Gly Thr Ser His Ser Lys Gly Gln Arg Ser Ser Ser Ser Thr Tyr
 405 410 415
 30 His Arg Gln Arg Arg His Ser Asp Phe Cys Gly Pro Ser Pro Ala Pro
 420 425 430
 Leu His Pro Lys Arg Ser Pro Thr Ser Thr Gly Glu Ala Glu Leu Lys
 435 440 445
 35 Glu Glu Arg Leu Pro Gly Arg Lys Ala Ser Cys Ser Thr Ala Gly Ser
 450 455 460
 Gly Ser Arg Gly Leu Pro Pro Ser Ser Pro Met Val Ser Ser Ala His
 465 470 475 480
 Asn Pro Asn Lys Ala Glu Ile Pro Glu Arg Arg Lys Asp Ser Thr Ser
 485 490 495
 45 Thr Pro Asn Asn Leu Pro Pro Ser Met Met Thr Arg Arg Asn Thr Tyr
 500 505 510
 Val Cys Thr Glu Arg Pro Gly Ala Glu Arg Pro Ser Leu Leu Pro Asn
 515 520 525
 50 Gly Lys Glu Asn Ser Ser Gly Thr Pro Arg Val Pro Pro Ala Ser Pro
 530 535 540
 Ser Ser His Ser Leu Ala Pro Pro Ser Gly Glu Arg Ser Arg Leu Ala
 545 550 555 560
 55 Arg Gly Ser Thr Ile Arg Ser Thr Phe His Gly Gly Gln Val Arg Asp

EP 1 282 700 B1

				565					570				575			
5	Arg	Arg	Ala	Gly 580	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Gln	Asn	Gly 590	Pro	Pro	
	Ala	Ser	Pro	Thr	Leu	Ala	His	Glu	Ala	Ala	Pro	Leu	Pro	Ala	Gly	Arg
			595					600					605			
10	Pro	Arg	Pro	Thr	Thr	Asn	Leu	Phe	Thr	Lys	Leu	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr
		610					615					620				
	Arg	Arg	Val	Ala	Asp	Glu	Pro	Glu	Arg	Ile	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr
15	625					630					635					640
	Ser	Cys	His	Leu	Pro	Trp	Asp	Gln	Thr	Glu	Thr	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
					645					650					655	
	Arg	Phe	Pro	Trp	Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Ser	Ser	Arg	Pro	Pro	Glu	Ala
20				660					665						670	
	Leu	Met	Ala	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Arg	Cys	Arg	Cys
			675					680					685			
	Arg	Gln	Pro	Gln	Pro	Phe	Leu	Leu	Ala	Cys	Leu	His	Gly	Gly	Ala	Gly
25		690					695					700				
	Gly	Pro	Glu	Pro	Leu	Ser	His	Phe	Glu	Val	Glu	Val	Cys	Gln	Leu	Pro
	705					710					715					720
	Arg	Pro	Gly	Leu	Arg	Gly	Val	Leu	Phe	Arg	Arg	Val	Ala	Gly	Thr	Ala
30					725					730					735	
	Leu	Ala	Phe	Arg	Thr	Leu	Val	Thr	Arg	Ile	Ser	Asn	Asp	Leu	Glu	Leu
35				740					745					750		

<210> 8

<211> 688

40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

45

50

55

EP 1 282 700 B1

	Met	Ser	Ser	Arg	Thr	Val	Leu	Ala	Pro	Gly	Asn	Asp	Arg	Asn	Ser	Asp
	1				5					10					15	
5	Thr	His	Gly	Thr	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Ser	Ser	Asp	Lys	Gly	Pro	Ser
				20					25					30		
	Trp	Ser	Ser	Arg	Ser	Leu	Gly	Ala	Arg	Cys	Arg	Asn	Ser	Ile	Ala	Ser
			35					40					45			
10	Cys	Pro	Glu	Glu	Gln	Pro	His	Val	Gly	Asn	Tyr	Arg	Leu	Leu	Arg	Thr
		50					55					60				
	Ile	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ala	Arg	His	Ile	Leu
15	65					70					75				80	
	Thr	Gly	Arg	Glu	Val	Ala	Ile	Lys	Ile	Ile	Asp	Lys	Thr	Gln	Leu	Asn
					85					90					95	

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 282 700 B1

Pro Ser Ser Leu Gln Lys Leu Phe Arg Glu Val Arg Ile Met Lys Gly
 100 105 110
 5 Leu Asn His Pro Asn Ile Val Lys Leu Phe Glu Val Ile Glu Thr Glu
 115 120 125
 Lys Thr Leu Tyr Leu Val Met Glu Tyr Ala Ser Ala Gly Glu Val Phe
 130 135 140
 10 Asp Tyr Leu Val Ser His Gly Arg Met Lys Glu Lys Glu Ala Arg Ala
 145 150 155 160
 Lys Phe Arg Gln Ile Val Ser Ala Val His Tyr Cys His Gln Lys Asn
 165 170 175
 15 Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ala Glu Asn Leu Leu Leu Asp Ala Glu
 180 185 190
 Ala Asn Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Phe Ser Asn Glu Phe Thr Leu
 195 200 205
 20 Gly Ser Lys Leu Asp Thr Phe Cys Gly Ser Pro Pro Tyr Ala Ala Pro
 210 215 220
 Glu Leu Phe Gln Gly Lys Lys Tyr Asp Gly Pro Glu Val Asp Ile Trp
 225 230 235 240
 25 Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Thr Leu Val Ser Gly Ser Leu Pro Phe
 245 250 255
 Asp Gly His Asn Leu Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Leu Arg Gly Lys
 260 265 270
 30 Tyr Arg Val Pro Phe Tyr Met Ser Thr Asp Cys Glu Ser Ile Leu Arg
 275 280 285
 Arg Phe Leu Val Leu Asn Pro Ala Lys Arg Cys Thr Leu Glu Gln Ile
 290 295 300
 35 Met Lys Asp Lys Trp Ile Asn Ile Gly Tyr Glu Gly Glu Glu Leu Lys
 305 310 315 320
 Pro Tyr Thr Glu Pro Glu Glu Asp Phe Gly Asp Thr Lys Arg Ile Glu
 325 330 335
 Val Met Val Gly Met Gly Tyr Thr Arg Glu Glu Ile Lys Glu Ser Leu
 340 345 350
 40 Thr Ser Gln Lys Tyr Asn Glu Val Thr Ala Thr Tyr Leu Leu Leu Gly
 355 360 365
 Arg Lys Thr Glu Glu Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Gly Leu Ala Leu
 370 375 380
 45 Ala Arg Val Arg Ala Pro Ser Asp Thr Thr Asn Gly Thr Ser Ser Ser
 385 390 395 400
 Lys Gly Thr Ser His Ser Lys Gly Gln Arg Ser Ser Ser Ser Thr Tyr
 405 410 415
 55 His Arg Gln Arg Arg His Ser Asp Phe Cys Gly Pro Ser Pro Ala Pro

EP 1 282 700 B1

Sequenz gemäß einer der SEQ ID Nr. 5-8 kodiert;

b) Nukleinsäure, die für ein Protein kodiert, das mindestens 70 % Identität zu einem Protein gemäß einer der SEQ ID Nr. 5-8 aufweist, und dessen Expression durch fokale cerebrale Ischämie und Reperfusion induziert werden kann.

- 5
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie für eine Proteinsequenz nach einer der SEQ ID Nr. 5-8 kodiert.
- 10
3. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie eine DNA ist.
4. Konstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure, nach einem der Ansprüche 1 bis 3, vorzugsweise unter der Kontrolle von die Expression regulierenden Elementen.
- 15
5. Konstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure, nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** sich die Nukleinsäure in Antisinnorientierung zu dem regulatorischen Element befindet.
6. Konstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** es in einem Plasmid vorliegt.
- 20
7. Wirtszelle, enthaltend ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 5.
8. Wirtszelle nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie ausgewählt wird aus Bakterien, Hefezellen und Säugerzellen.
- 25
9. Isoliertes Säugergewebe-, organ und/oder nicht-menschlicher transgener Säuger, enthaltend ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 5.
10. Wirtszelle und/oder Säugergewebe und/oder Säugerorgan und/oder nicht-menschlicher transgener Säuger nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Nukleinsäure bzw. das Konstrukt in einer Stelle des Genoms integriert ist, die nicht seiner natürlichen Position entspricht.
- 30
11. Protein, erhältlich durch Expression einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in einem Expressionssystem, vorzugsweise einer Wirtszelle.
- 35
12. Protein, dessen Expression durch fokale cerebrale Ischämie und Reperfusion induziert werden kann, erhältlich durch Expression einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in einem Expressionssystem, vorzugsweise einer Wirtszelle.
- 40
13. Protein nach Anspruch 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** es ausgewählt wird aus einem Protein mit einer der Sequenzen gemäß SEQ ID Nr. 5 bis 8 und Proteinen, die zu einem der genannten Proteine zu mindestens 70 % identisch sind und deren Expression durch fokale cerebrale Ischämie und Reperfusion induziert werden kann.
14. Antikörper, der mit einem Protein nach einem der Ansprüche 11 bis 13 spezifisch reagiert.
- 45
15. Diagnosekit, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und/oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 5 und/oder ein Protein nach einem der Ansprüche 11 bis 13 und/oder einen Antikörper nach Anspruch 14.
- 50
16. Verfahren zur Diagnose eines Apoplexierisikos, umfassend den Schritt: Bestimmen des Expressionsspiegels einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder der Menge an Protein nach einem der Ansprüche 11 bis 13 in einer Patientenprobe.
17. Verfahren nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Patientenprobe mit einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und/oder einem Antikörper nach Anspruch 14 in Kontakt gebracht wird.
- 55
18. Verfahren zum Identifizieren und/oder Isolieren eines Protein-Kinaseinhibitors, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Protein-Kinaseaktivität eines Proteins nach einem der Ansprüche 11 bis 13 in Anwesenheit und Abwesenheit der Testsubstanz bestimmt wird und die so als geeignet identifizierte Substanz isoliert wird.

EP 1 282 700 B1

19. Protein-Kinaseassay, **dadurch gekennzeichnet**, das die untersuchte Protein-Kinase ein Protein nach einem der Ansprüche 11 bis 13 umfasst.
- 5 20. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine Nukleinsäure, ein Konstrukt, eine Wirtszelle, Protein und/oder einen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 14.
- 10 21. Verwendung einer Nukleinsäure, eines Konstrukts, einer Wirtszelle, eines Proteins und/oder eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikaments für die Prophylaxe und/oder Therapie neurologischer Erkrankungen, einschließlich Schlaganfall, Multiple Sklerose, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose; Heterodegenerative Ataxien, Morbus Huntington, Neuropathien und Epilepsien und/oder Tumorerkrankungen, insbesondere Karzinome.

Claims

- 15 1. A nucleic acid that encodes for a neuronal serine threonine protein kinase, selected from
- 20 a) a nucleic acid with one of the sequences according to SEQ ID NO: 1 to 4 and a nucleic acid that encodes for a protein with a sequence according to one of SEQ ID NO: 5 to 8;
- 25 b) a nucleic acid that encodes for a protein that exhibits at least 70% identity to a protein according to one of SEQ ID NO: 5 to 8, and whose expression can be induced by focal cerebral ischaemia and reperfusion.
2. The nucleic acid according to claim 1, **characterised in that** it encodes for a protein sequence according to one of SEQ ID NO: 5 to 8.
3. The nucleic acid according to claims 1 to 2, **characterised in that** it is a DNA.
4. A construct containing a nucleic acid according to any one of claims 1 to 3, preferably, under control of expression-regulating elements.
- 30 5. A construct containing a nucleic acid according to claim 4, **characterised in that** the nucleic acid is in antisense orientation to the regulatory element.
6. The construct according to one of the foregoing claims, **characterised in that** it is present in a plasmid.
- 35 7. A host cell containing a construct according to claims 4 to 5.
8. The host cell according to claim 7, **characterised in that** it is selected from bacteria, yeast cells and mammalian cells.
- 40 9. An isolated mammalian tissue, organ and/or non-human transgenic mammal containing a construct according to any one of claims 4 to 5.
10. The host cell and/or the mammalian tissue and/or the mammalian organ and/or non-human transgenic mammal according to one of the foregoing claims, **characterised in that** the nucleic acid or construct is integrated in a position of the genome that does not correspond to its natural position.
- 45 11. A protein obtainable by expression of a nucleic acid according to any one of claims 1 to 3 in an expression system, preferably, a host cell.
- 50 12. A protein whose expression can be induced by focal cerebral ischaemia and reperfusion, obtainable by expression of a nucleic acid of one of claims 1 to 3, in an expression system, preferably a host cell.
- 55 13. The protein according to claim 11 or 12, **characterised in that** it is selected from a protein with one of the sequences according to SEQ ID NOs. 5 to 8 and proteins that are at least 70% identical to one of the said proteins and whose expression can be induced by focal cerebral ischaemia and reperfusion.
14. An antibody that specifically reacts with a protein according to any one of claims 11 to 13.

EP 1 282 700 B1

15. A diagnostic kit containing a nucleic acid according to any one of claims 1 to 3 and/or a construct according to any one of claims 4 to 5 and/or a protein according to any one of claims 11 to 13 and/or an antibody according to claim 14.
- 5 16. A method for the diagnosis of a risk of apoplexy comprising the step of determination of the level of expression of a nucleic acid according to any one of claims 1 to 3 or the quantity of protein according to any one of claims 11 to 13 in a patient sample.
- 10 17. The method according to claim 16, **characterised in that** the patient sample is brought into contact with a nucleic acid according to any one of claims 1 to 3 and/or an antibody according to claim 14.
- 15 18. A method for the identification and/or isolation of a protein kinase inhibitor, **characterised in that** the protein kinase activity of a protein according to any one of claims 11 to 13 is determined in the presence and absence of the test substance and the substance thus identified is isolated.
- 20 19. A protein kinase assay, **characterised in that** the protein kinase investigated comprises a protein according to any one of claims 11 to 13.
- 25 20. A pharmaceutical composition containing a nucleic acid, a construct, a host cell, a protein and/or an antibody according to any one of claims 1 to 14.
21. Use of a nucleic acid, a construct, a host cell, a protein and/or an antibody according to any one of claims 1 to 14 for the prophylaxis and/or therapy of neurological diseases, including stroke, multiple sclerosis, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, heterodegenerative ataxias, Huntington's disease, neuropathies and epilepsies and/or tumor diseases, particularly carcinomas.

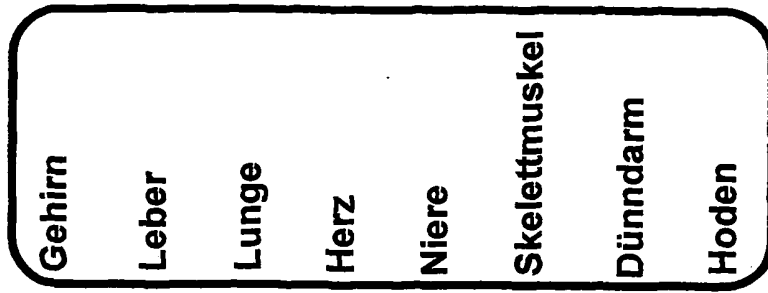
Revendications

- 30 1. Acide nucléique, qui code une protéine kinase sérine thréonine neuronale, choisi parmi
- a) l'acide nucléique ayant une des séquences d'après les SEQ ID N°1-4 et l'acide nucléique, qui code une protéine ayant une séquence selon l'une des SEQ ID N°5-8 ;
- b) l'acide nucléique qui code une protéine, qui présente une identité d'au moins 70 % avec une protéine selon l'une des SEQ ID N°5-8, et dont l'expression peut être induite par une ischémie et reperfusion cérébrale focale.
- 35 2. Acide nucléique selon la revendication 1, **caractérisé en ce qu'il** code une séquence de protéine selon l'une des SEQ ID N°5-8.
- 40 3. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 2, **caractérisé en ce que** c'est un ADN.
4. Hybride, contenant un acide nucléique, selon l'une des revendications 1 à 3, de préférence sous le contrôle d'éléments régulateurs de l'expression.
- 45 5. Hybride, contenant un acide nucléique, selon la revendication 4, **caractérisé en ce que** l'acide nucléique se trouve en orientation antisens par rapport à l'élément régulateur.
6. Hybride selon l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce qu'il** se présente dans un plasmide.
- 50 7. Cellule hôte, contenant un hybride selon l'une des revendications 4 à 5.
8. Cellule hôte selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les bactéries, les cellules de levures et les cellules de mammifères.
- 55 9. Tissu, organe isolé de mammifère et/ou de mammifère transgénique non humain, contenant un hybride selon l'une des revendications 4 à 5.
10. Cellule hôte et/ou tissu de mammifère et/ou organe de mammifère et/ou de mammifère trans-génique non humain selon l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** l'acide nucléique ou l'hybride est intégré dans

EP 1 282 700 B1

un endroit du génome qui ne correspond pas à sa position naturelle.

- 5
11. Protéine, pouvant être obtenue par l'expression d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un système d'expression, de préférence une cellule hôte.
12. Protéine, dont l'expression peut être induite par une ischémie et une reperfusion cérébrale focale, pouvant être obtenue par l'expression d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un système d'expression, de préférence une cellule hôte.
- 10
13. Protéine selon la revendication 11 ou 12, **caractérisée en ce qu'elle** est choisie parmi une protéine ayant une des séquences selon la SEQ ID N°5 à 8 et des protéines, qui sont identiques à une des protéines citées à au moins 70 % et dont l'expression peut être induite par une ischémie et une reperfusion cérébrale focale.
14. Anticorps qui réagit spécifiquement avec une protéine selon l'une des revendications 11 à 13.
- 15
15. Kit diagnostique, contenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 et/ou un hybride selon l'une des revendications 4 à 5 et/ou une protéine selon l'une des revendications 11 à 13 et/ou un anticorps selon la revendication 14.
- 20
16. Procédé pour le diagnostic d'un risque d'apoplexie, comprenant l'étape consistant à : déterminer le taux d'expression d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 ou la quantité de protéine selon l'une des revendications 11 à 13 dans un échantillon prélevé chez un patient.
- 25
17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'échantillon prélevé chez un patient est mis en contact avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 et/ou un anticorps selon la revendication 14.
- 30
18. Procédé pour identifier et/ou isoler un inhibiteur de protéine kinase, **caractérisé en ce que** l'activité de protéine kinase d'une protéine selon l'une des revendications 11 à 13 est déterminée en la présence ou en l'absence de la substance test et la substance ainsi identifiée de manière appropriée est isolée.
- 35
19. Dosage de protéine kinase, **caractérisé en ce que** la protéine kinase analysée comprend une protéine selon l'une des revendications 11 à 13.
- 40
20. Composition pharmaceutique, contenant un acide nucléique, un hybride, une cellule hôte, une protéine et/ou un anticorps selon l'une des revendications 1 à 14.
- 45
21. Utilisation d'un acide nucléique, d'un hybride, d'une cellule hôte, d'une protéine et/ou d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 14 pour la fabrication d'un médicament destiné à la prophylaxie et/ou la thérapie des maladies neurologiques, y compris l'attaque, la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, les ataxies hétérodégénératives, la maladie de Huntington, les neuropathies, et les épilepsies et/ou affections tumorales, en particulier les carcinomes.
- 50
- 55



- 9B5

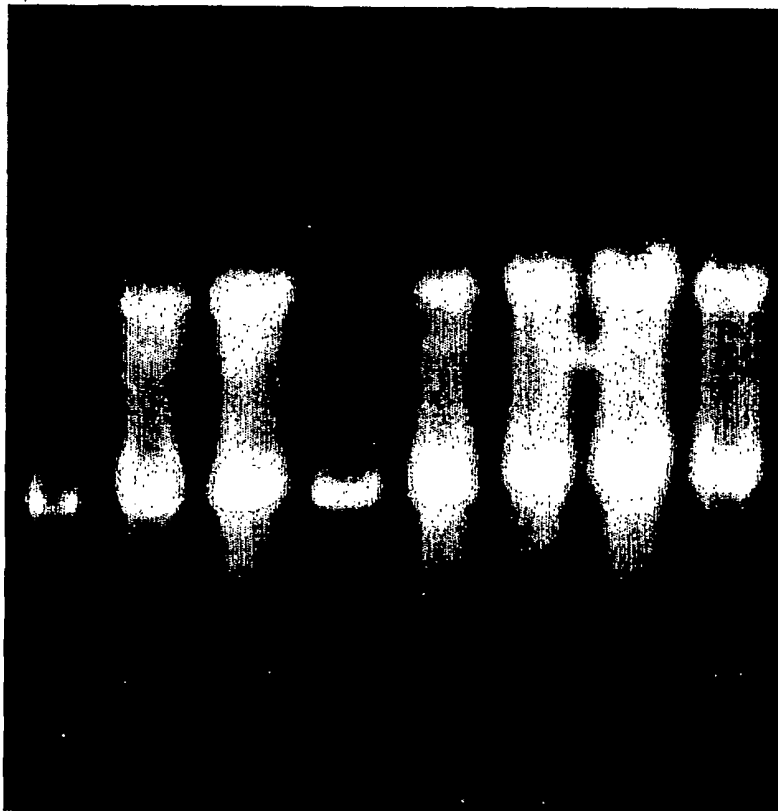


Abbildung 2: Gewebeverteilung von 9B5 in der Ratte

Gewebeverteilung von 9B5 beim Menschen

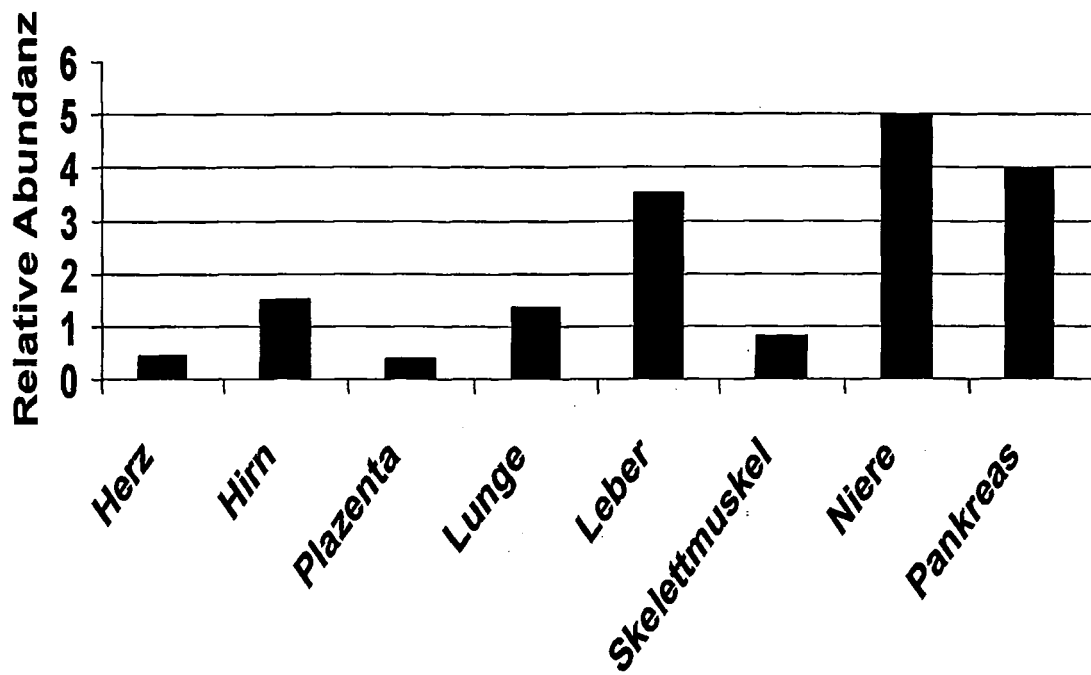
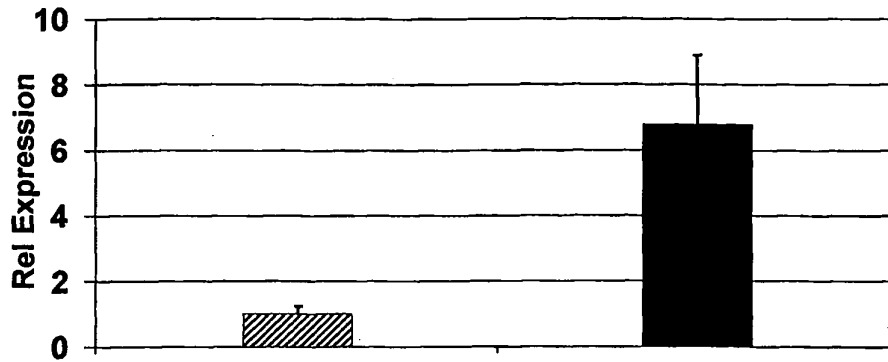
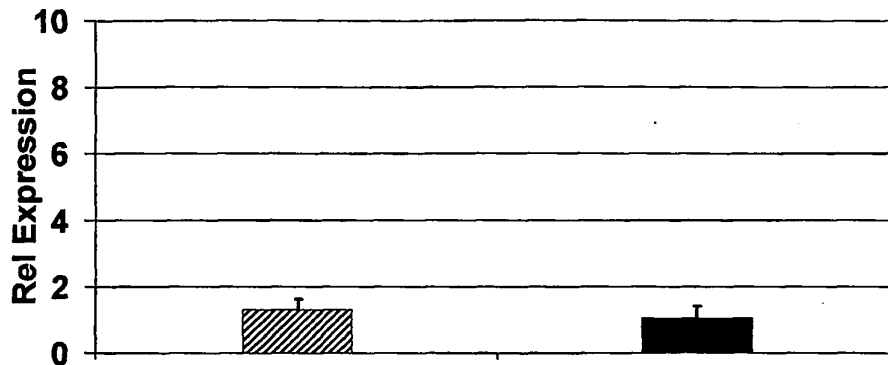


Abbildung 3: Gewebeverteilung von 9B5 im Menschen

9B5 Expression nach 90 min MCAO und 2 h Reperfusion



9B5 Expression nach 90 min MCAO und 6 h Reperfusion



9B5 Expression nach 24 h MCAO

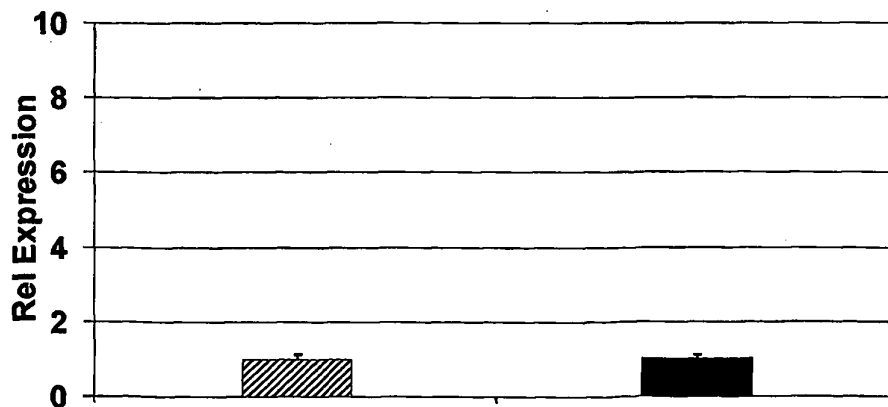


Abbildung 4: Induktion von 9B5 durch fokale cerebrale Ischämie

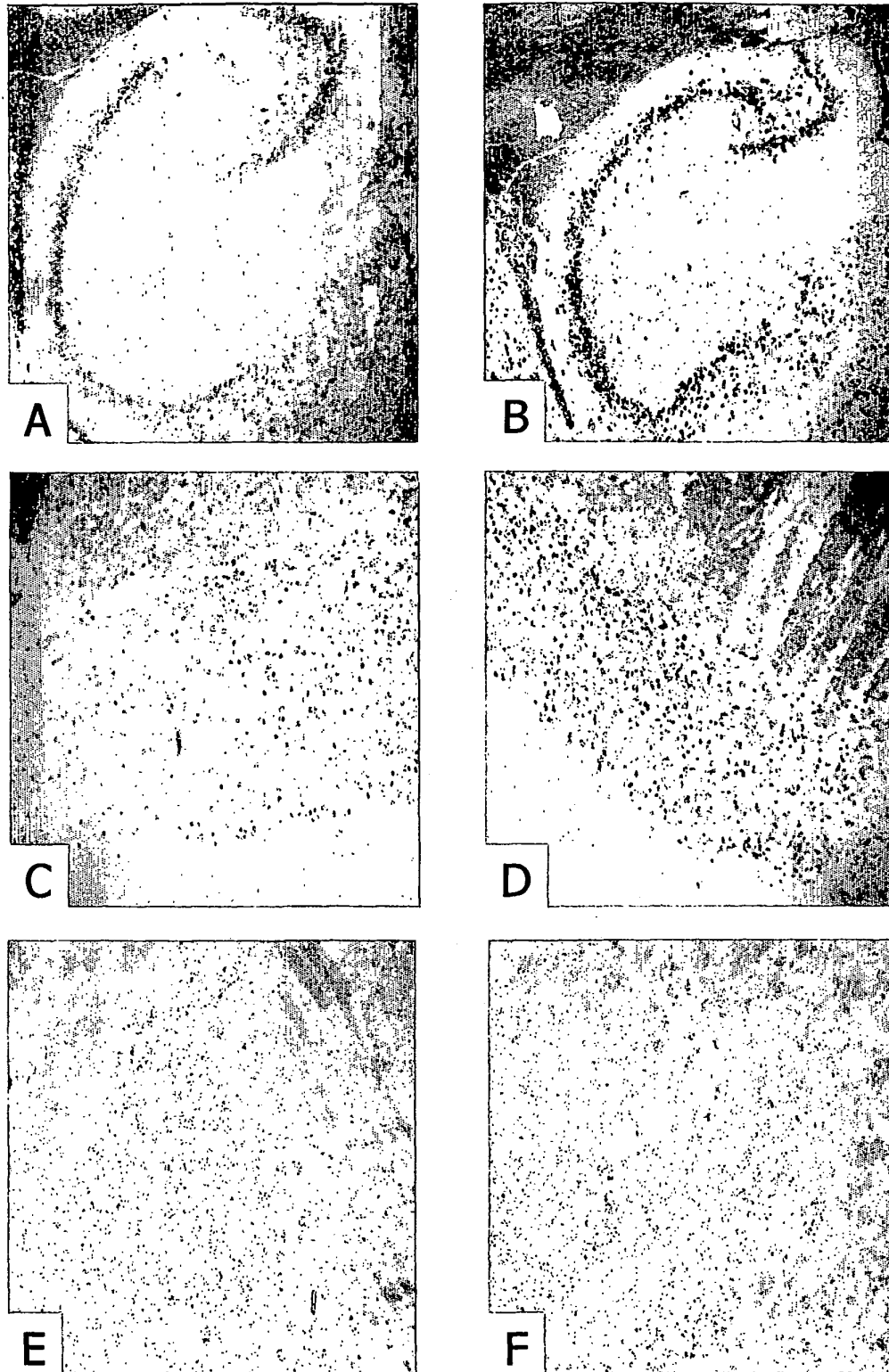


Abbildung 5: *In situ* Hybridisierung von Mäusehirnen nach fokaler Ischämie: A, B Hippocampus, jeweils kontralateral vs. ischämische Seite; C,D Cortex; E,F Thalamus.

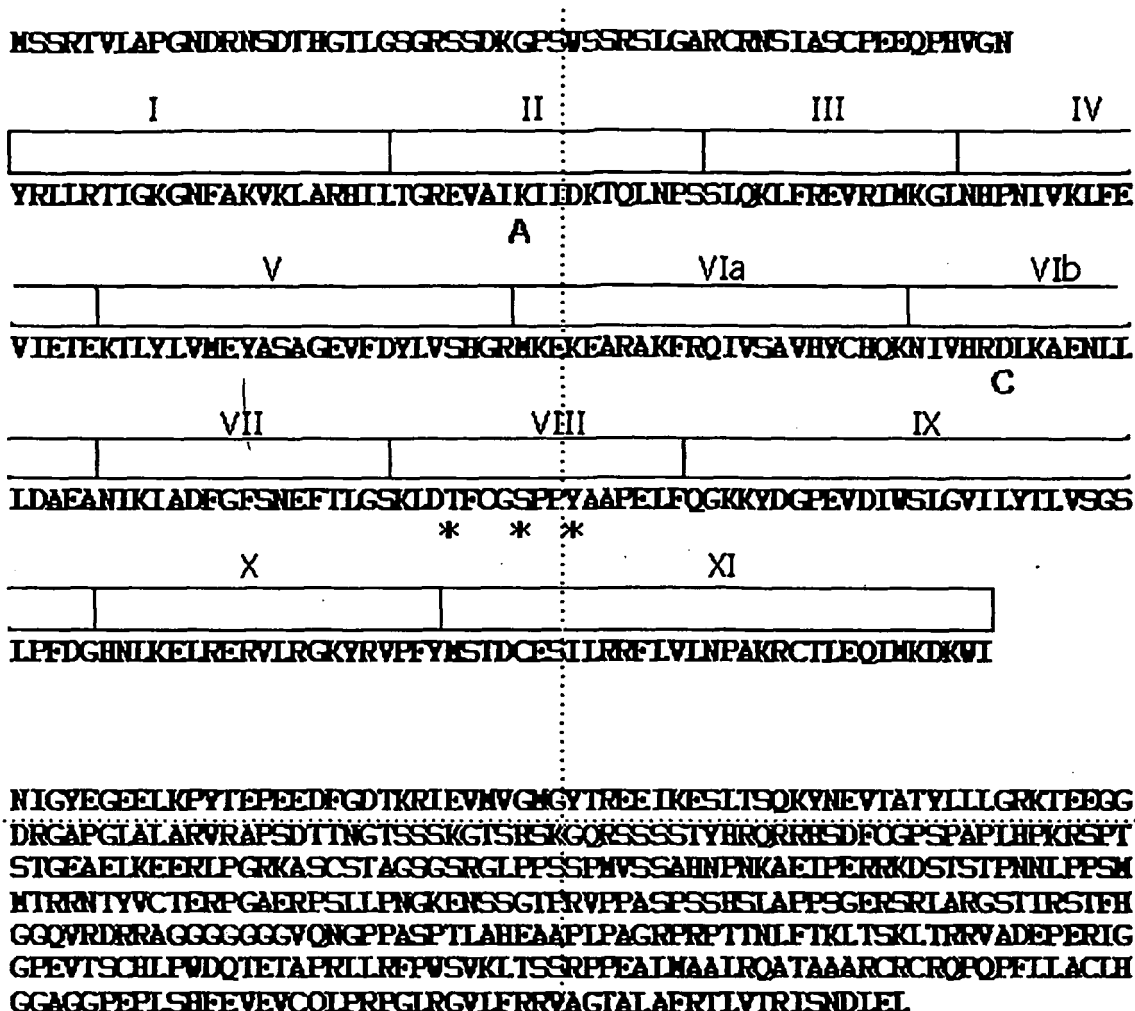


Abbildung 6: Katalytische Region von 9B5

I= Phosphatanker, VIb = katalytische Region, VII-VIII = Aktivationsloop, I-XI = Subdomänen der katalytischen Region (nach Hanks and Hunter, 1995),

* = Aktivierungsstellen, A= ATP-bindende Stelle, C= Aktives Zentrum.

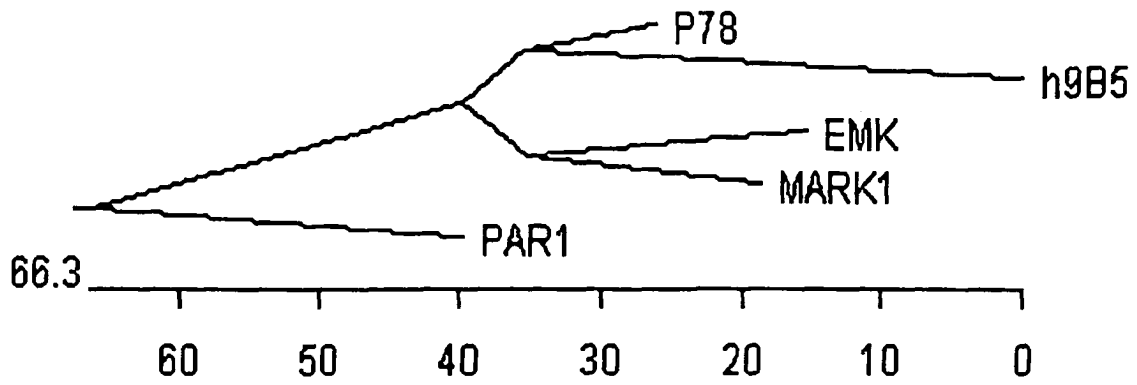


Abbildung 7: Phylogenetischer Baum der Homologen

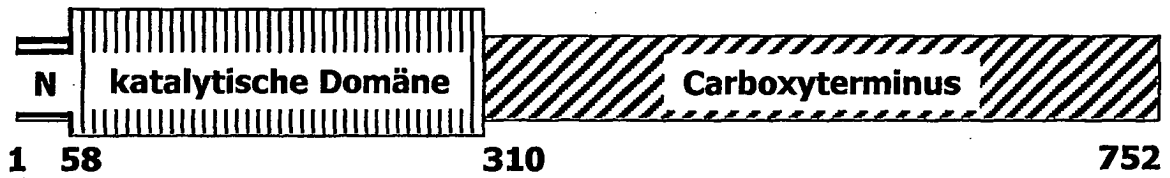


Abbildung 8: Domänenaufbau von 9B5

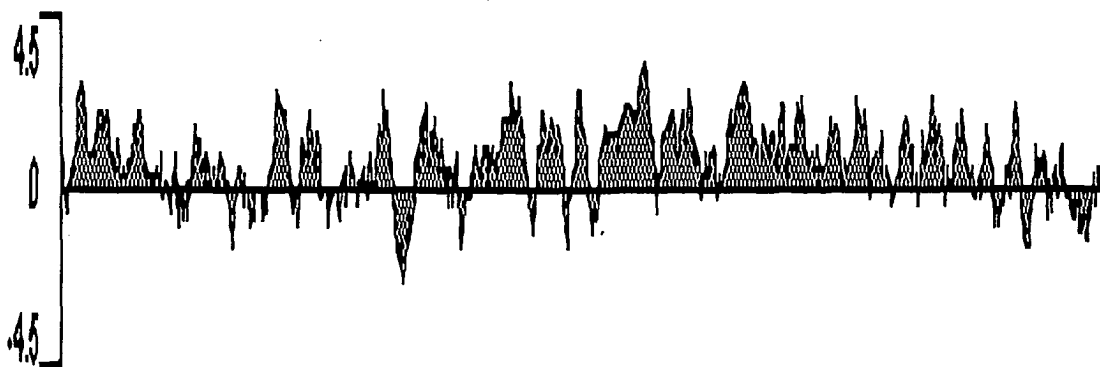


Abbildung 9: Hydrophobizitätsplot nach Kyte-Doolittle

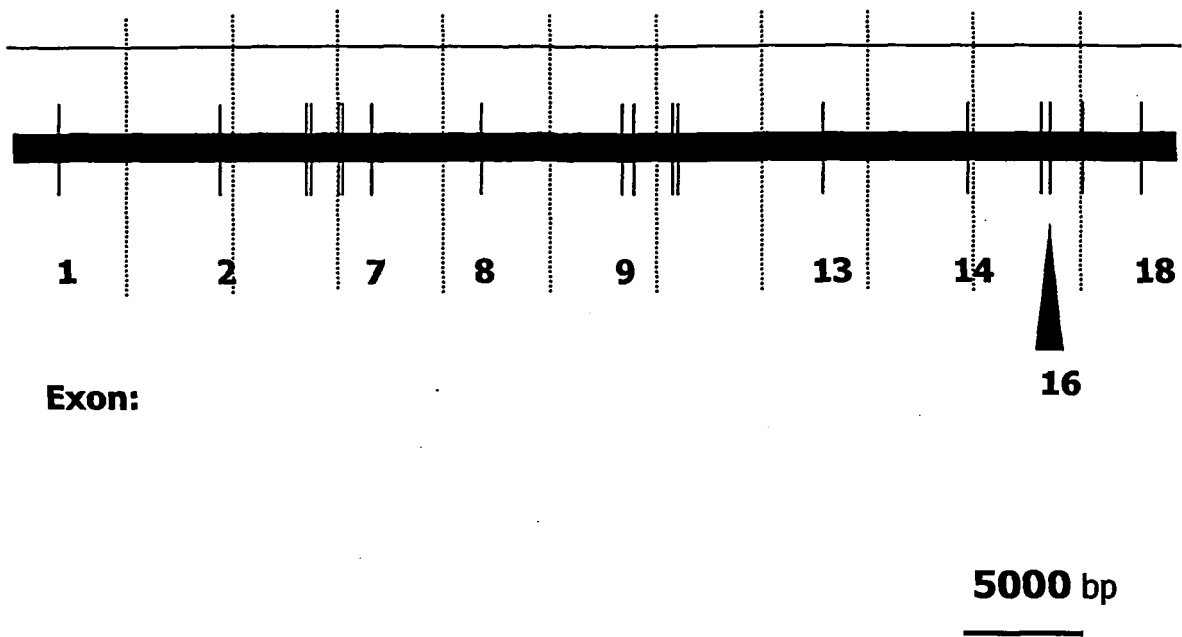


Abbildung 10: Genomische Struktur von 9B5 beim Menschen.

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- WO 9801756 A [0045]
- EP 0743367 A2 [0071]
- US 5876932 A [0071]
- US 5945418 A [0090]
- WO 9220642 A [0090]
- WO 9414808 A [0090]
- US 5330992 A [0090]
- US 5217999 A [0090]
- US 5302606 A [0090]
- EP 0566266 A1 [0090]
- WO 9403427 A [0090]
- WO 9221660 A [0090]
- WO 9115495 A [0090]

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **ALTSCHUL et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0007]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0011]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1985 [0011]
- *Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, 1985 [0011]
- *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, 1991 [0011]
- **STUDIER et al.** *Meth. Enzymol.*, 1990, vol. 185, 60-89 [0020]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1998 [0020] [0024] [0029]
- *Laboratory protocols for conditional gene targeting*. Oxford University Press, 1997 [0024]
- **ALTSCHUL et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 250, 403-410 [0025]
- **HARLOW, E. ; LANE, D.** *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1988 [0029]
- **HANKS ; HUNTER.** *FASEB J.*, 1995, vol. 9, 576-596 [0040]
- **VERGLEICH HANKS ; LINDBERG.** *Methods Enzymol.*, 1991, vol. 200, 525-32 [0044]
- **HANKS ; HUNTER.** *Faseb J.*, 1995, vol. 9, 576-96 [0044] [0048] [0048]
- **DREWES et al.** *Cell*, 1997, vol. 89, 297-308 [0044]
- **HUANG ; ERIKSON.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, vol. 91, 8960-3 [0047]
- **CLARK et al.** *Neurol. Res.*, 1997, vol. 19, 641-648 [0051]
- **SCHNEIDER et al.** *Nat Med*, 1999, vol. 5, 554-9 [0051]
- **ATKINS et al.** *Stroke*, 1996, vol. 27, 1682-1687 [0051]
- **NOGAWA et al.** *J. Neurosci.*, 1997, vol. 17, 2746-2755 [0051]
- **SCHNEIDER et al.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, vol. 92, 4447-51 [0052]
- **ROSSNER et al.** *Mol Cell Neurosci*, 1997, vol. 9, 460-475 [0054]
- **TOBIUME et al.** *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 239, 905-10 [0057]
- **BERESTETSKAYA et al.** *J Biol Chem*, 1997, vol. 273, 27816-23 [0057]
- **CHEN et al.** *Oncogene*, 1999, vol. 18, 173-80 [0057]
- **INBAL et al.** *Nature*, vol. 390, 180-4 [0057]
- **LEVY-STRUMPF ; KIMCHI.** *Oncogene*, 1998, vol. 17, 3331-40 [0057]
- **SANJO et al.** *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, 29066-71 [0057] [0079] [0079]
- **KAWAI et al.** *Mol Cell Biol*, 1998, vol. 18, 1642-51 [0057]
- **INBAL et al.** *Mol Cell Biol*, 2000, vol. 20, 1044-54 [0057]
- **ROBERTS et al.** *Science*, 2000, vol. 287, 873-80 [0058]
- **KLETSAS ; PAPA VASSILIOU.** *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 1999, vol. 8, 737-746 [0059]
- **GRAVES et al.** *J Biol Chem*, 2000, vol. 275, 5600-5 [0062]
- **CHANG et al.** *Science*, 1998, vol. 281, 1860-3 [0079] [0083]
- **NINOMIYA-TSUJI, et al.** *Nature*, 1999, vol. 398, 252-6 [0079]
- **NINOMIYA-TSUJI et al.** *Nature*, 1999, vol. 398, 252-6 [0079]
- **MOCHLY-ROSEN ; GORDON.** *Faseb J.*, vol. 12, 35-42 [0082]
- **BLANAR ; RUTTER.** *Science*, 1998, vol. 256, 1014-8 [0082]
- **CHAPLINE et al.** *J Biol Chem*, 1992, vol. 268, 6858-61 [0082]
- **CHAPLINE et al.** *J Biol Chem*, 1993, vol. 271, 6417-22 [0082]

EP 1 282 700 B1

- **KAELIN et al.** *Cell*, 1996, vol. 70, 351-64 [0082]
- **SONGYANG et al.** *Curr Biol*, 1994, vol. 4, 973-82 [0082]
- **FIELDS ; SONG.** *Nature*, 1989, vol. 340, 245-6 [0083] [0083] [0083] [0083]
- **YASUDA et al.** *Mol Cell Biol*, vol. 19, 7245-54 [0083]
- **WHITMARSH ; DAVIS.** *Trends Biochem Sci*, 1999, vol. 23, 481-5 [0083]
- **WHITMARSH et al.** *Science*, 1998, vol. 281, 1671-4 [0083]
- **ZHANG et al.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, vol. 96, 8511-5 [0087] [0087] [0090] [0095]
- **ICHIJO et al.** *Science*, 1997, vol. 275, 90-4 [0087] [0087] [0090] [0090] [0095]
- **REUTER et al.** *Methods in Enzymology*, 1995, vol. 255, 245 [0090]
- **ZHANG et al.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, vol. 96, 8591-5 [0090]